





# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

DIPARTIMENTO DI PEDIATRIA  
CLINICA DI ONCOEMATOLOGIA PEDIATRICA

SCUOLA DI DOTTORATO IN  
MEDICINA DELLO SVILUPPO E SCIENZE DELLA PROGRAMMAZIONE

INDIRIZZO: IMMUNOLOGIA ED EMATOONCOLOGIA

XXI CICLO

Tesi di Dottorato

**HEAT SHOCK PROTEIN 70 NEL LINFOMA ANAPLASTICO A GRANDI  
CELLULE: RUOLO, ESPRESSIONE E CORRELAZIONE CON LA TIROSIN  
CHINASI NPM-ALK**

**DIRETTORE DELLA SCUOLA:** Ch.mo Prof. GIUSEPPE BASSO

**SUPERVISORE:** Dott. ANGELO ROSOLEN

**DOTTORANDO:** Dott. ELISA ZORZI



# INDICE

|   |               |
|---|---------------|
| <b>RIASSUNTO</b>  | <b>pag. 1</b> |
| <b>SUMMARY</b>  | <b>pag. 3</b> |
| <b>1. INTRODUZIONE:</b>   |               |
| 1.1. Linfomi anaplastici a grandi cellule: caratteristiche clinico-biologiche | <b>pag. 5</b> |
| 1.2. Heat shock proteins e HSF1   | <b>pag. 8</b> |
| 1.3. Hsp70: ruolo patogenico e antiapoptotico                                 | <b>pag.11</b> |
| <b>2. MATERIALI E METODI:</b>   |               |
| 2.1. Colture cellulari  | <b>pag.15</b> |
| 2.2. Reagenti ed anticorpi  | <b>pag.15</b> |
| 2.3. Immunoblotting e immunoprecipitazione                                    | <b>pag.16</b> |
| 2.4. Subfrazionamento cellulare   | <b>pag.16</b> |
| 2.5. Immunofluorescenza   | <b>pag.17</b> |
| 2.6. Real time PCR  | <b>pag.18</b> |
| 2.7. Immunoistochimica  | <b>pag.18</b> |
| <b>3. RISULTATI:</b>  |               |
| 3.1 Espressione di Hsp70 e HSF1 in ALCL                                       | <b>pag.19</b> |
| 3.2 Attività di HSF1 e interazione con hsp70                                  | <b>pag.20</b> |
| 3.3 Ruolo antiapoptotico di hsp70 in linee di ALCL NPM-ALK <sup>+</sup>       | <b>pag.22</b> |
| 3.4 Espressione di hsp70 in campioni biotipici di ALCL                        | <b>pag.23</b> |
| 3.5 Relazione tra NPM-ALK e hsp70   | <b>pag.24</b> |
| <b>4. DISCUSSIONE</b>   | <b>pag.27</b> |
| <b>5. BIBLIOGRAFIA</b>  | <b>pag.33</b> |
| <b>FIGURE</b>   | <b>pag.39</b> |



## RIASSUNTO

I linfomi anaplastici a grandi cellule (ALCL) pediatrici sono caratterizzati, per più dell'90%, dalla presenza della caratteristica traslocazione cromosomica t(2;5) da cui origina il trascritto codificante per NPM-ALK, chinasi oncogena essenziale per la trasformazione della cellula linfoide normale e per la sopravvivenza della cellula neoplastica. Oltre al suo potenziale promitogenico e antiapoptotico mediato dall'attivazione dei *pathway* di PI3K/Akt e STAT3, studi recenti hanno dimostrato il ruolo di NPM-ALK nell'attivazione di MEK, ERK1/2 e p38-MAPK. Tuttavia, nonostante le numerose conoscenze sull'attività trasformante di NPM-ALK sia *in vivo* che *in vitro*, poco è noto sui meccanismi di chemioresistenza indotti dalla stessa chinasi, anche se forte rimane l'interesse per lo sviluppo di strategie terapeutiche mirate per la cura dell'ALCL.

In un nostro studio precedente abbiamo dimostrato che in linee cellulari di ALCL NPM-ALK positive (NPM-ALK<sup>+</sup>) l'inibitore proteosomale Bortezomib (BZ) provoca l'induzione di Hsp70, una *heat shock protein* normalmente coinvolta nella maturazione e nella preservazione della conformazione della maggioranza delle proteine cellulari ma che induce anche fenomeni di chemioresistenza in molti modelli sperimentali tumorali.

In questo studio abbiamo quindi valutato lo stato e la funzione di Hsp70 in linee cellulari e in preparati istologici di pazienti pediatrici affetti da ALCL, e i possibili meccanismi di resistenza al trattamento farmacologico (BZ) o allo stress cellulare (*heat shock*, HS) che favorirebbero la sopravvivenza delle cellule NPM-ALK<sup>+</sup>. Abbiamo dimostrato che Hsp70 risulta espressa ad alti livelli nelle linee cellulari NPM-ALK<sup>+</sup> grazie alla capacità di queste cellule di attivare efficacemente il fattore di trascrizione delle hsp, HSF1. Dalle nostre analisi è emerso inoltre che Hsp70 interagisce con HSF1 nella sua forma fosforilata e attiva, ma solo nelle linee cellulari NPM-ALK<sup>+</sup>. Ciò lascia supporre che Hsp70 possa regolare positivamente la trascrizione delle hsp mediante un meccanismo a *feed-back*.

Inoltre abbiamo dimostrato che, quando indotta dopo trattamento con BZ o shock termico, in linee cellulari NPM-ALK<sup>+</sup> Hsp70 previene la perdita dell'omeostasi mitocondriale e il rilascio transmembrana di fattori apoptogenici, attraverso l'inibizione della proteina pro-apoptotica mitocondriale Bax. Questo giustificerebbe la resistenza al trattamento farmacologico evidenziata nelle linee cellulari NPM-ALK<sup>+</sup> rispetto alla linea di ALCL che non esprime NPM-ALK.

L'analisi dell'espressione di Hsp70 è stata quindi estesa a 23 preparati istologici di pazienti pediatrici affetti da ALCL, 20 NPM-ALK<sup>+</sup> e 3 NPM-ALK<sup>-</sup>. Mediante analisi

immunoistochimica, abbiamo verificato che la totalità delle biopsie NPM-ALK<sup>+</sup> è risultata positiva ad Hsp70, rispetto a solo uno su tre dei casi NPM-ALK<sup>-</sup>, confermando statisticamente ( $p=0.019$ ) una correlazione tra la presenza di NPM-ALK e Hsp70. Data la limitata numerosità dei campioni non è stato possibile correlare in maniera statistica l'espressione di Hsp70 con l'andamento della malattia, ma è da sottolineare come il 67% dei casi (4/6) con elevata espressione di Hsp70 (valore attribuito pari a 3, in una scala di espressione crescente da 0 a 3) siano recidivati o deceduti, contro solo il 25% (3/12) dei casi con espressione della proteina assente o intermedia (compresa tra 0 e 2, nella stessa scala).

Abbiamo verificato poi, che l'espressione del trascritto Hsp70 in biopsie linfonodali di bambini affetti da ALCL NPM-ALK<sup>+</sup>, è significativamente più elevata rispetto a quella riscontrata nei linfonodi reattivi non patologici ( $p=0.049$ ).

Per valutare il possibile ruolo di NPM-ALK nell'induzione di Hsp70, prima di esporre le cellule di ALCL in studio a trattamento con BZ o a calore (HS), la sua attività chinasi è stata inibita farmacologicamente (WHI-P154). I nostri studi dimostrano che nelle cellule trattate con WHI-P154, sia singolarmente che in combinazione con BZ o HS, HSF1 rimane localizzato nel citoplasma con conseguente calo del trascritto e dell'espressione di Hsp70.

Infine abbiamo dimostrato che la combinazione di dosi singolarmente non citotossiche, o al più citostatiche di BZ e WHI-P154, inibisce la proliferazione cellulare e induce apoptosi nelle linee cellulari che esprimono NPM-ALK, effetto al quale concorre l'inibizione della trascrizione e dell'espressione di Hsp70, oltre ad altri numerosi fattori dipendenti dall'attività della chinasi.

## SUMMARY

Anaplastic Large Cell Lymphoma (ALCL) belongs to the group of high grade non Hodgkin Lymphomas, described as a T- or null-cells origin large-cell lymphoma. More than 90% of all ALCL are characterized by the chromosomal translocation t(2;5)(p23;q35), which fuses the ALK tyrosine kinase receptor with the nuclear NPM (nucleophosmin) genes. The resulting constitutively activated kinase NPM-ALK, leads to activation of signaling pathways involved in survival and cell proliferation through activation of PI3K/Akt and STAT3. More recently NPM-ALK has been shown to regulate the activation of MEK, ERK1/2 and p38-MAPK, as well. Previously we have demonstrated that treatment of NPM-ALK<sup>+</sup> ALCL cells with proteasome inhibitor Bortezomib (BZ) causes the induction of Hsp70, a heat shock protein relevant for the maintenance of the cellular homeostasis through the conservation and correct folding of newly synthesized and/or denatured proteins. This is also helpful for several tumor models, in which drug-induced protein misfolding and degradation is preceded by cell cycle arrest and apoptosis. In this study we evaluated the expression and functional role of Hsp70 in ALCL cell lines and in lymph nodal biopsies, assessing its anti-apoptotic activity after drug treatment (Bortezomib) or cellular stress (heat shock, HS). Our results demonstrate that Hsp70 is over-expressed in NPM-ALK<sup>+</sup> ALCL cell lines following activation of the hsp transcription factor, HSF1, most likely through a positive feedback mechanism.

Furthermore, when assessing the anti-apoptotic activity of over-expressed Hsp70 after Bortezomib (BZ) treatment in NPM-ALK<sup>+</sup> cells, we demonstrated that Hsp70 prevents the loss of mitochondrial membrane permeabilization by binding and sequestering pro-apoptotic protein Bax into the cytoplasm, lowering drug sensitivity compared to NPM-ALK<sup>-</sup> cells.

Hsp70 expression analysis was extended to 23 biopsies of ALCL, 20 NPM-ALK<sup>+</sup> and 3 NPM-ALK<sup>-</sup>. Tissue array analysis demonstrated that 20/20 NPM-ALK<sup>+</sup> ALCL biopsies were Hsp70 positive compared to 1/3 NPM-ALK<sup>-</sup> ALCL biopsies. Such a difference was also statistically significant, whereas, due to the small number of cases, a statistical correlation between Hsp70 expression and patient outcome could not be demonstrated. However it is worth of noting that 4/6 (67%) patients with an Hsp70 expression value of 3 (in a range between 0 and 3) relapsed or died compared to only 3/12 (25%) of the patients with a protein expression value ranging between 0 and 2, regardless NPM-ALK status and activity.

Finally transcription of Hsp70 was evaluated by RQ-PCR in 4 healthy control lymph nodes and 10 NPM-ALK<sup>+</sup> ALCL lymph node biopsies, demonstrating that in NPM-ALK<sup>+</sup> ALCL lymph nodes over-expression of Hsp70 reflect increased gene promoter activity, respect to

healthy lymphonodes as verified also through a statistical analysis. To test if NPM-ALK plays a role in Hsp70 induction via HSF1 activity, we treated ALCL cell lines with WHI-P154, an ATP-competitive small molecule inhibitor of ALK kinase, before exposing cells to BZ or HS, and showed HSF1 retention in the cytoplasm and Hsp70 mRNA and protein expression downregulation.

We further observed a marked down regulation of the MAPK p38, among the downstream NPM-ALK effector proteins, along with the HSF1 inhibition described above. Notably, inhibition of p38 reduced significantly Hsp70 expression in NPM-ALK<sup>+</sup> ALCL cells, supporting a role of the NPM-ALK/p38 axis in the regulation of the HSF1/hsp70 pathway in these cells, but also encouraging future investigations. This kinase may have some effect on HSF1, but this hypothesis warrants further investigation. Indeed cytostatic concentrations of Bortezomib and WHI-P154 given together induced cell death in NPM-ALK<sup>+</sup> ALCL cell lines, at least in part because of Hsp70 downregulation.

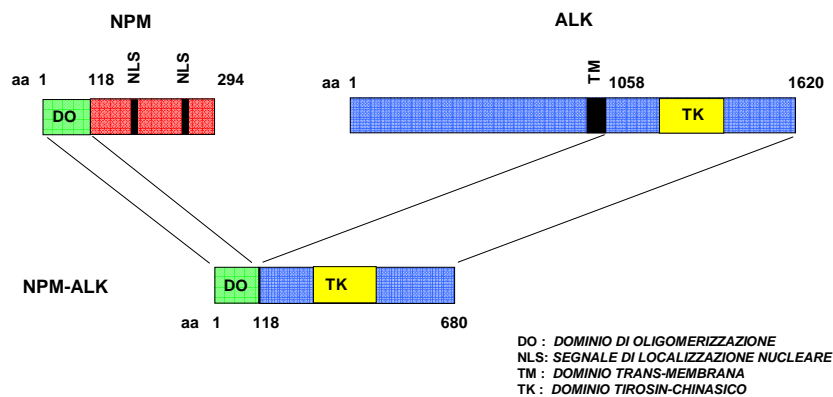
## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 Linfomi anaplastici a grandi cellule (ALCL): caratteristiche clinico-biologiche.

I Linfomi Anaplastici a Grandi Cellule (ALCL) sono stati descritti per la prima volta nel 1984 da Stein come una neoplasia ad interessamento linfonodale paracorticale ed intrasinusoidale, caratterizzata da foglietti di grandi cellule anaplastiche [1]. I linfomi anaplastici, denominati anche linfomi CD30<sup>+</sup>, per la presenza sulla membrana plasmatica del recettore CD30 appartenente alla famiglia del Tumor Necrosis Factor (TNF), rappresentano circa il 5-10% di tutti i linfomi non-Hodgkin dell'adulto ed il 15-20% dei linfomi a grandi cellule dell'infanzia. La loro classificazione è tuttora oggetto di controversie per quanto riguarda la loro origine cellulare. Le cellule neoplastiche che esprimono l'antigene CD30 possono essere di origine T, B o non-T/non-B (null). Tuttavia molti concordano nel classificare come linfomi anaplastici a grandi cellule quelli esclusivamente di origine T o null, considerando invece quelli di origine B, linfomi non-Hodgkin a grandi cellule [2, 3]. Dal punto di vista molecolare il 60% degli ALCL dell'adulto e il 85% dei linfomi ALCL diagnosticati nel bambino esprime una variante tronca e costitutivamente attiva della tirosin-chinasi di membrana ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase), la cui mancata espressione nei tessuti linfo-ematopoietici di natura non neoplastica permette oggi di utilizzare tale proteina come marcatore diagnostico specifico dei linfomi ALCL e di suddividere ulteriormente questi linfomi in ALCL ALK-positivi (ALK<sup>+</sup>) ed ALK-negativi (ALK<sup>-</sup>)[4]. Tra gli ALCL ALK<sup>+</sup>, il 90% presenta la caratteristica traslocazione reciproca tra il cromosoma 2 ed il cromosoma 5: t(2;5)(p23;q35).

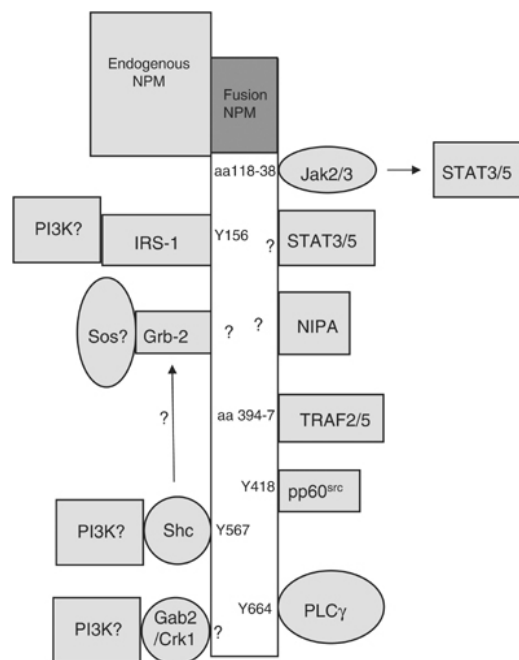
Il clonaggio dei punti di rottura dei due cromosomi ha permesso di identificare i due geni coinvolti in tale riarrangiamento cromosomico: NPM (nucleophosmin o B23) sul cromosoma 5, ed ALK sul cromosoma 2. Il gene di fusione risultante esprime una proteina di circa 80 kDa, ad attività tirosin-chinasica (NPM-ALK/p80) a localizzazione citoplasmatica e nucleare [5, 6]. Nel restante 15% degli ALCL ALK-positivi la proteina di fusione è localizzata esclusivamente nel citoplasma. Analisi citogenetiche più approfondite hanno però rivelato in questi restanti casi la presenza di aberrazioni cromosomiche differenti dalla t(2;5). Quelle più frequenti e meglio caratterizzate dal punto di vista molecolare, quali t(1;2)(q25;p23); t(2;3)(p23;q21) e inv(2)(p23q35), danno origine rispettivamente ai prodotti di fusione TPM3-ALK, TFG-ALK ed ATIC-ALK [7-9]. Dal punto di vista clinico-patologico i linfomi ALCL si presentano spesso alla diagnosi in stadio III o IV e sono quindi particolarmente aggressivi. Nonostante l'aggressività, il sottotipo istologico che esprime la proteina NPM-ALK nell'adulto risponde meglio alla chemioterapia rispetto agli ALCL ALK-negativi, mentre ciò

non è definito per l'ambito pediatrico, dove l'esiguo numero di pazienti ha limitato gli studi sul valore prognostico dell'espressione della proteina ALK, rilevata mediante immunohistochimica ed RT-PCR, e non ha permesso di osservare una significativa differenza in termini di sopravvivenza, tra linfomi ALK<sup>+</sup> ed ALK<sup>-</sup> [10, 11]. Dal punto di vista molecolare, NPM-ALK rappresenta una proteina di fusione ad attività tirosin chinasi di 680 aa costituita nei primi 118 aminoacidi dalla porzione aminoterminale di NPM, una fosfoproteina nucleare coinvolta nella formazione ed aggregazione dei complessi ribonucleoproteici nucleolari, così come nella duplicazione centrosomica e nell'avvio della fase di mitosi del ciclo cellulare [12]. I restanti 562 aminoacidi risultano costituiti dalla porzione citoplasmatica del recettore di membrana ad attività tirosin-chinasi ALK (aa 1058-1620) la cui elevata omologia di sequenza con il recettore LTK (Leukocyte Tyrosine Kinase) conferma la sua appartenenza alla famiglia dei recettori insulino-simili [13].



Ad eccezione di alcuni tessuti di origine neuroectodermica, il recettore ALK non è normalmente espresso nei tessuti maturi, mentre la sua espressione è stata osservata in tumori quali il rhabdomyosarcoma, neuroblastoma, glioblastoma e melanoma, così come nelle linee cellulari derivate da questi [14]. A differenza del recettore ALK, la cui attività chinasi dipende da una dimerizzazione ligando-dipendente, NPM-ALK è costitutivamente attivata dal dominio di oligomerizzazione di NPM conservato nella proteina di fusione e la sua espressione viene controllata dal promotore del gene NPM, trascritto sia in cellule quiescenti sia in cellule attivamente proliferanti. La localizzazione cellulare è altrettanto importante per l'attività chinasi, dal momento che la possibilità di formare omodimeri attivi NPM-ALK/NPM-ALK sembra ristretta al pool citoplasmatico della proteina di fusione e non al pool nucleare, costituito quest'ultimo da eterodimeri NPM/NPM-ALK enzimaticamente

inattivi [15]. Nel citoplasma NPM-ALK si associa e controlla la fosforilazione di diverse proteine adattatrici contenenti domini di omologia SH2 e SH3 (src homology-2 ,-3 domain) o PTB (phosphotyrosine binding domain), quali Shc, Grb2, IRS-1 e PLC $\gamma$ 1. Tuttavia, ad eccezione di Grb2 il cui ruolo nella propagazione dello stimolo mitogenico NPM-ALK-dipendente è ancora ignoto, solo PLC $\gamma$ -1 è necessario per l'attività trasformante di NPM-ALK, mentre Shc ed IRS-1 non influiscono sulla proprietà trasformante della proteina [16, 17]. Grazie a studi di mutagenesi sito specifica è stato possibile identificare la tirosina (Y664) responsabile del legame con PLC- $\gamma$ , dal momento che la mutazione di tale residuo aminoacidico blocca la fosforilazione della proteina e lo stimolo pro-mitogenico indotto da essa [18]. La PLC- $\gamma$ , metabolizza il fosfatidilinositolo 4,5 bifosfato in inositolo-3-fosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG), i quali inducono rispettivamente, la mobilizzazione del calcio dal reticolo endoplasmico e l'attivazione della PKC.



*Leukemia* (2005) **19**, 1128–1134.

L'espressione di NPM-ALK è in grado di trasformare *in vitro* una grande varietà di modelli cellulari, sia di natura ematopoietica che epiteliale, e di indurre *in vivo* crescita tumorale [15-19]. Tuttavia sebbene l'espressione ectopica della proteina sia in grado di trasformare *in vitro* fibroblasti immortalizzati inducendo l'iper-espressione di diversi geni coinvolti nel controllo della proliferazione cellulare, come alcune cicline cellulari (A e D1) così come di alcuni geni coinvolti in meccanismi di trasduzione del segnale (*c-myc*, *c-fos* e *c-jun*) [20], l'identità dei geni che cooperano con NPM-ALK nella trasformazione della cellula ematopoietica *in vivo*

non è ancora nota. Ad esempio, nelle linee cellulari di ALCL che esprimono NPM-ALK, l'espressione di questi stessi geni è alquanto variabile, e non sempre evidenti risultano le differenze di espressione genica tra tumori ALCL ALK-positivi e -negativi [21, 22].

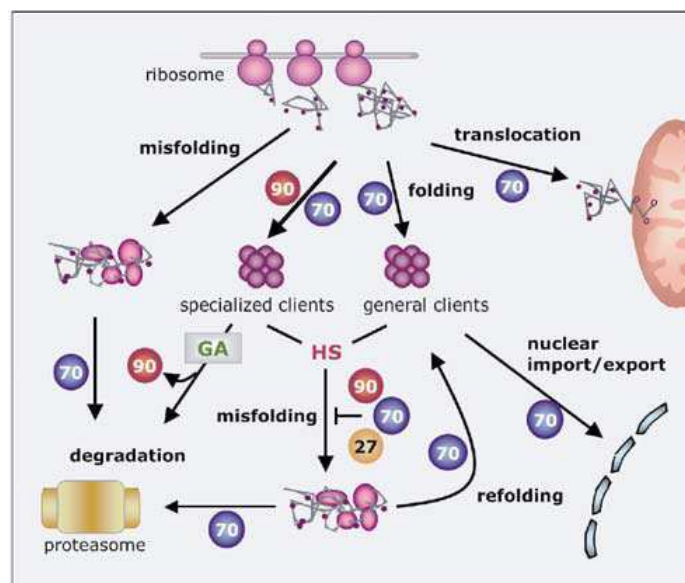
Recentemente diversi studi hanno sottolineato l'importanza dell'attività anti-apoptica di NPM-ALK, ad esempio la sua espressione ectopica in cellule COS-1 riduce drasticamente la morte cellulare, mediante attivazione del pathway PI3K/Akt [23]. PI3K (Phospho-Inositol-3-Kinase) è un eterodimero composto da una subunità catalitica (p110) e una regolatoria (p85), e la sua attivazione può dipendere sia dall'associazione con tirosin-chinasi transmembrana che citosoliche. PI3K si associa ad NPM-ALK, viene fosforilata e induce l'attivazione della chinasi serinica PKB/Akt, coinvolta quest'ultima nella crescita tumorale NPM-ALK-dipendente [23, 24]. In accordo con il ruolo antiapoptotico di NPM-ALK, due studi indipendenti hanno dimostrato la diretta interazione della chinasi tirosinica con il fattore di trascrizione STAT3- $\alpha$  e - $\beta$ , sia in linee cellulari di ALCL che in fibroblasti murini esprimenti stabilmente l'oncogene *npm-alk*. STAT3 risulta costitutivamente fosforilato e localizzato a livello nucleare sia nelle linee cellulari che nei linfomi ALCL ALK-positivi [25, 26].

Da questi presupposti si evince che l'attività pro-mitogenica e anti-apoptica NPM-ALK-dipendente sia uno tra gli eventi fondamentali nella linfomagenesi degli ALCL, e che il ripristino dei meccanismi fisiologici cellulari come l'amplificazione e l'esecuzione del meccanismo di morte cellulare debba rappresentare una delle vie principali d'azione dei farmaci antineoplastici di nuova generazione.

## **1.2 Heat shock proteins e HSF1**

La maturazione, la localizzazione cellulare e quindi l'attività della maggior parte delle proteine strutturali e funzionali della cellula è in molti casi il risultato dell'interazione con particolari molecole note come *chaperone* molecolari. Questa classe di proteine è rappresentata dalle *heat shock proteins* (hsp), scoperte perchè prodotte in seguito a heat shock (shock da calore), ma successivamente osservate anche in conseguenza di trattamenti farmacologici o stress ossidativo. Tra le funzioni fisiologiche esercitate da questi *chaperone* ci sono: il movimento di proteine all'interno dei compartimenti cellulari; il folding (ripiegamento) di proteine citosoliche, del reticolo endoplasmico, e mitocondriali; il contributo alla degradazione di proteine instabili; la preservazione dalla formazione di complessi e aggregati proteici; e l'azione di re-folding delle proteine parzialmente denaturate o non correttamente conformate [27, 28].

Le *heat shock proteins* sono divise in due grandi gruppi: quelle ad alto peso molecolare e basso peso molecolare. Le proteine del secondo gruppo sono dette ATP-indipendenti, tra queste c'è hsp27; le proteine del primo gruppo invece sono divise in tre ulteriori famiglie: Hsp70 (Hsp70, Hsc70, Grp78,...), Hsp90 (Hsp90 $\alpha$ , Hsp90 $\beta$ ) e Hsp60. Alcune di queste sono espresse costitutivamente, mentre altre vengono trascritte solo in condizioni di stress e si collocano all'interno di diversi compartimenti cellulari come citosol, reticolo endoplasmico, mitocondrio. Queste proteine sono chaperone molecolari ATP-dipendenti e richiedono la presenza di cofattori detti co-chaperone, che regolano l'affinità di legame tra le hsp e l'ADP o ATP, tra questi: Hsp40, Hop, Hip, Hip, Bag1.

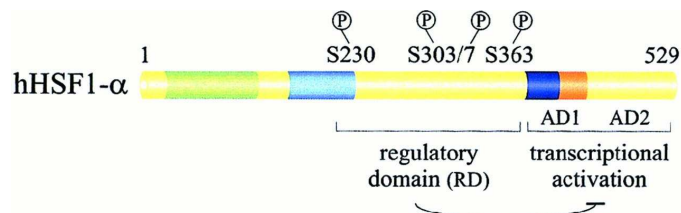


*Oncogene (2004) 23, 2907–2918*

Le hsp hanno il compito di regolare la stabilità di diverse sottoclassi di proteine: recettori degli ormoni steroidei, chinasi seriniche/treoniniche e fattori di trascrizione, oltre che di diverse chinasi tirosiniche spesso deregolate nella cellula neoplastica. Per questo assolvono ad una funzione citoprotettiva e sono spesso abbondantemente espresse nelle cellule tumorali per le quali favoriscono l'adattamento a cambiamenti del microambiente o a condizioni citotossiche, come i trattamenti chemioterapici [27, 29-31]. Nel caso di risposta a stress cellulare, l'attivazione della trascrizione dei geni '*heat shock*' è mediata dal fattore HSF1 (Heat Shock Factor 1) [32], che riconosce e lega all'interno dei loro promotori, specifiche sequenze dette HSE (heat shock elements).

HSF1, nella sua forma monomerica inattiva, è localizzato nel citoplasma, ma in seguito a segnali stimolatori va incontro ad omo-trimerizzazione, seguita da fosforilazioni in particolari

serine, e migrazione al nucleo. La sequenza di HSF1 è costituita da vari domini funzionali, tra cui un dominio di legame al DNA (DBD); due domini di attivazione trascrizionale localizzati all'estremità C-terminale (AD1, AD2) e un dominio regolatorio (RD) che controlla AD1/2 e che contiene siti specifici per fosforilazioni seriniche, costitutive ed inducibili, che modulano l'attività del fattore di trascrizione. Ad esempio HSF1 è negativamente regolato dalle fosforilazioni in serina 307 e 303 da parte di ERK1/2 e GKS-3 $\beta$  e in serina 363 da parte di JNK; mentre invece la fosforilazione in particolare di JNK2, sembra avere una regolazione di tipo positivo, come la fosforilazione in serina 230 per la quale non è ancora stata identificata chiaramente alcuna chinasi responsabile [33-39]



*Pirkkala et Al. The FASEB Journal Vol. 15 May 2001*

Ad oggi, i siti specifici coinvolti nell'attivazione di HSF1 sono ancora scarsamente noti, è certo comunque che sia un meccanismo necessario anche se non sufficiente all'attivazione del fattore di trascrizione in condizioni di stress [40].

Oltre alla fosforilazione, il legame con le hsp è elemento fondamentale tra i meccanismi regolatori dell'attività di HSF1 e in particolare con Hsc70, Hsp70, Hsp25 e Hsp90.

Di recente è stato dimostrato che Hsc70 interagisce con la porzione C-terminale di HSF1 e che ciò favorisce la trimerizzazione e l'attività trascrizionale di HSF1 in seguito ad heat shock [41]. Hsp90 ed Hsp70 al contrario, in numerosi studi, sono stati descritti avere un ruolo di tipo inibitorio nei confronti del loro fattore di trascrizione. Il legame tra HSF1 e Hsp90/70 è riscontrabile in condizioni fisiologiche a livello citoplasmatico dove le due hsp lo mantengono in uno stato inattivo. In condizioni di stress, l'affinità di legame tra gli chaperone e HSF1 diminuisce e l'equilibrio viene sbilanciato a favore del grande numero di proteine aggregate o non correttamente conformate o degradate, le hsp si staccano così da HSF1 permettendone l'attivazione [42-44]. Di recente però Seo et al. hanno dimostrato come l'induzione di Hsp70 e Hsp25 favorisca la fosforilazione di MKP1 che a sua volta produce la defosforilazione e inattivazione di ERK1/2 impedendo a quest'ultima di regolare negativamente HSF1.

Nello stesso studio hanno inoltre dimostrato che l'induzione di Hsp70 e Hsp25 incrementa l'espressione delle hsp stesse e che in cellule trasfettate stabilmente con vettori inducenti Hsp25 e Hsp70 si verifica inibizione della fosforilazione di ERK1/2 e stabilizzazione di HSF1 [45].

### **1.3 Hsp70: ruolo patogenico e antiapoptotico**

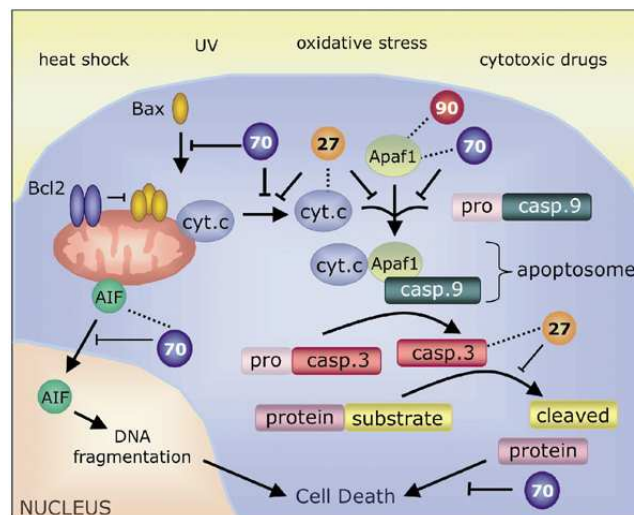
Hsp70 viene prodotta ad alti livelli e con cinetica molto rapida in risposta a stress citotossici, infatti questo chaperone, oltre alla proprietà di legare i substrati in uno stato conformazionale intermedio e di prevenirne l'aggregazione legando all'interno delle sequenze aminoacidiche dei siti idrofobici, ha anche la capacità, al contrario di hsp90, di catalizzare la corretta riconformazione del substrato stesso, sfruttando una reazione energetica e dipendente dalla presenza di co-chaperone come Hsp40.

Hsp70 è infatti costituito da due gruppi aminoacidici principali: il primo, N-terminale (45kDa), dove si colloca il dominio ATPasico, e il secondo, C-terminale (15kDa) dove si trova il dominio di legame per i substrati proteici. Quest'ultimo, in dipendenza dal ciclo di idrolisi dell'ATP, può subire dei cambi conformazionali, in particolare nello stato legato all'ADP, Hsp70 assume una conformazione che ha alta affinità per il ligando mentre, quando legato all'ATP, viene stimolato un rapido rapporto di scambio con il substrato proteico. Il ciclo di legame e rilascio tra Hsp70 e la proteina substrato può essere influenzato dal legame con i co-chaperone, che possono stimolare o rallentare il ciclo dell'ATP [30].

E' stato poi osservato che l'attività di Hsp70 appare particolarmente importante in cellule in cui sono presenti proteine mutate o prodotti di ricombinazioni geniche, che sembrano infatti necessitare della presenza dello chaperone per la loro conservazione e il mantenimento della loro attività funzionale. Alternativamente la proteina mutata può essere legata e segnalata per la degradazione dalle hsp, come nel caso della variante  $\Delta F508$  del regolatore trans membrana della fibrosi cistica (CFTR), o la superossido dismutasi mutata (SOD1) e contribuirne all'eliminazione. Hsp70 può quindi, da un lato contribuire a indurre stati patologici, come ad esempio l'oncogenesi, stabilizzando i suoi substrati, come nel caso di p53 mutata, o rappresentare un potenziale strumento terapeutico nelle malattie neurodegenerative, come la Sclerosi Amiotrofica Laterale (mutazioni di SOD1) o il Morbo di Parkinson [28].

Hsp70, oltre a contribuire a meccanismi di oncogenesi, ha un ruolo determinante sia nel mantenimento della elevata capacità di replicazione e proliferazione della cellula tumorale sia nella preservazione dall'induzione di morte cellulare programmata [46, 47] [48]. Hsp70 infatti ha la capacità di legare proteine coinvolte nell'attivazione ed esecuzione della via apoptotica

mitocondriale e di inibirne la funzione e l'attività, tra queste ad esempio la proteina pro-apoptotica Bax. Bax è una proteina citosolica che in seguito a stimolo apoptotico o a heat shock modifica la propria conformazione e dimerizza a livello mitocondriale formando dei pori che inducono la depolarizzazione della membrana e permettono il rilascio di fattori apoptogenici quali AIF o Citocromo C. Hsp70 quando sovra-espressa, come si osserva in diversi modelli cellulari tumorali, può legare Bax in conformazione attiva a livello citoplasmatico e impedirne la migrazione al mitocondrio e la dimerizzazione inibendone l'azione pro-apoptotica. Oltre a Bax, Hsp70 ha la capacità di legare il citocromo C a livello citoplasmatico, impedendo la formazione dell'apoptosoma, complesso proteico formato da Citocromo C, ATP, APAF-1, e Caspasi-9, che ha la funzione di attivare tramite taglio proteolitico la proteasi effettrice del meccanismo apoptotico, ovvero la caspasi-3 [49-54].



*Oncogene* (2004) 23, 2907–2918. doi:10.1038/sj.onc.1207529

In vari studi è stato dimostrato come l'elevata espressione di Hsp70 possa correlare con una minore risposta a trattamento farmacologico e con una prognosi più infausta. Ad esempio è stato dimostrato che l'elevata espressione di Hsp70 in cellule ottenute da pazienti affetti da leucemia mieloide acuta, è associata ad un peggior andamento della malattia [55].

Altri due studi recenti riportano che Hsp70 quando sovra-espressa è associata a fenomeni di resistenza a Imatinib sia in linee cellulari che in blasti di pazienti affetti da leucemia mieloide cronica e anche a Paclitaxel, in cellule HL60 (AML) trasfettate con vettore di espressione per Bcr-Abl e in K562 (CML Bcr-Abl<sup>+</sup>). Il ruolo di Hsp70 nella resistenza mediata da Bcr-Abl è stato approfondito anche in uno studio seguente, nella stessa linea cellulare di AML trasfettata

con un vettore inducibile per Bcr-Abl e in cellule di CML, trattate con etoposide, citarabina e doxorubicina [56-58].

E' noto in particolar modo, che il trattamento con inibitori proteosomali quali lactacystin, MG132, Bortezomib, induce l'accumulo di proteine non correttamente conformate o parzialmente denaturate che generano una condizione di forte instabilità cellulare. Questo induce un aumento della fosforilazione serinica di HSF1, che localizza nel nucleo in strutture puntiformi note come "stress granuli", e promuove la trascrizione di Hsp70 [59-64].

Da un'analisi di espressione genica in cellule di linfoma B trattate con Bortezomib, Hsp70 è risultato 8 volte meno espresso nella cellule sensibili al trattamento, rispetto a quelle resistenti, nelle medesime condizioni sperimentali [65]. L'induzione di Hsp70 è infatti un meccanismo che limita l'efficacia di questi farmaci e, nello specifico Bortezomib, dal momento che favorisce la preservazione delle proteine denaturate durante il trattamento e la probabilità che si instaurino meccanismi di resistenza.

Questo ha portato a sviluppare nuove strategie terapeutiche mirate alla riduzione dell'espressione di Hsp70, come recenti inibitori della trascrizione delle hsp (silenziamento trascrizionale, KNK-437, triptolide, emunina e derivati), da utilizzare in combinazione a trattamenti convenzionali o alle nuove molecole chemioterapiche che hanno come effetto collaterale l'induzione degli stessi chaperone molecolari [66-68]. In tal senso è stato dimostrato sinergismo tra KNK-437 e Bortezomib, MG132, Melphalan e 17-AAG, in cellule di leucemia, mieloma multiplo o carcinoma prostatico, rispettivamente; come anche tra resveratrolo e inibitori di Hsp90 in cellule di CML. [66, 69-73].



## **2. MATERIALI E METODI**

### **2.1 Colture cellulari**

Linee cellulari umane di ALCL, KARPAS, SR786, SUDHL1, SUPM2 che presentano la traslocazione t(2;5)(p23;q35), e FE-PD, modello negativo per la traslocazione, sono state mantenute in coltura con RPMI addizionato di glutammina (2mM), penicillina (100U/ml) e streptomina (100ug/ml), FCS inattivato al 15%, a 37°C, e 5% di CO<sub>2</sub>.

### **2.2 Reagenti ed anticorpi**

Bortezomib fornito da Millennium (Millennium Pharmaceuticals Inc., USA) è stato disciolto in DMSO, aliquotato e mantenuto a -80°C. I reagenti per la quantificazione proteica (BCA<sup>TM</sup> protein quantitation assay) sono stati acquistati da Pierce (Pierce Chemical Co., USA). La soluzione chemiluminescente impiegata per la determinazione delle proteine sulle membrane di nitrocellulosa (Schleicher & Schuell), è stata acquistata da Chemicon (Chemicon International Inc., USA). Gli anticorpi monoclonali anti-Citocromo C (7H8), Bax (N20), sono stati acquistati da Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) così come gli anticorpi anti-HDAC1 (H-51), anti-Stat3, e anti Hsp70 utilizzato in immunostochimica. L'anticorpo policlonale anti-p21<sup>WAF1</sup> è stato acquistato da BD Biosciences (BD Biosciences Clontech, USA) e l'anticorpo monoclonale anti-Caspasi-3 da Alexis Biochemicals (Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland). L'anticorpo policlonale anti-Bax 6A7 è stato acquistato da Upstate (Upstate Inc., USA). L'anticorpo anti-ALK è stato ottenuto da Zymed Laboratories (Invitrogen corporation, USA). Gli anticorpi anti-p38, -ERK, -JNK, e le loro forme fosforilate sono stati acquistati da Cell Signaling (Cell Signaling technology, Inc.) così come PARP e anti-phospho ALK. Gli anticorpi anti-Hsp70, -Hsp40, -Hsp90, -Hsp60, -HSF1, -Hsc70 sono stati acquistati da Stressgen (Assay Designs, USA). Gli anticorpi secondari perossidati sheep anti-mouse e donkey anti-rabbit sono stati acquistati da Amersham (GE Healthcare, USA). Gli anticorpi secondari rodamina-coniugati Goat-anti-mouse ALEXA 546 e ficoeritrina-coniugati Goat-anti-rabbit ALEXA 488, e il colorante fluorescente nucleare DAPI sono stati acquistati da Molecular Probes (Molecular Probes, Inc., USA). L'inibitore delle caspasi Z-VAD-fmk è stato acquistato da Biomol (BIOMOL International LP, USA), l'inibitore di ALK, WHI-P154 e SB202190 da Calbiochem (Calbiochem, San Diego, CA).

### **2.3 Immunoblotting e immunoprecipitazione**

Le cellule seminate ad una concentrazione di  $0.5 \times 10^6$ /ml dopo 2 lavaggi in PBS 1x sono state risospese in buffer di lisi [Tris-HCl 50 mM, pH 7.5; NaCl 150 mM; 0.1% TritonX-100; EDTA 2 mM; 0.5% deoxicolic acid; 0.1% SDS; aprotinina 20µg/ml; leupeptina 20µg/ml; PMSF 1mM] ed incubate in ghiaccio per 20 minuti. I lisati cellulari sono stati poi purificati mediante centrifugazione a 4°C, ( $14.000 \times g$  per 30 min), e il surnatante, rappresentativo sia della frazione citosolica che di quella nucleare solubile, sono stati recuperati. 30µg di lisato proteico, diluito in soluzione riducente RLB, sono stati risolti su gel di poliacrilamide (8%-15% SDS-PAGE). Per immunoprecipitazione è stato usato un buffer di lisi con CHAPSO 1% tale da preservare le interazioni tra proteine [5mM MgCl<sub>2</sub>; 137mM KCl, 1mM EDTA-EGTA; 1%CHAPSO, 20mM TrisHCl pH 7.5], gli estratti proteici ottenuti sono stati quindi incubati con 1-2µg di anticorpo specifico a 4°C per una notte. Gli immunocomplessi sono stati quindi precipitati con circa 100µl di Protein A Sepharose-beads (GE Healthcare, USA) per 2h a 4°C, lavati abbondantemente nello stesso buffer di lisi e caricati in gel di acrilamide in condizioni riducenti dopo riscaldamento dei campioni con RLB a 95°C.

### **2.4 Subfrazionamento cellulare**

Per purificare la frazione citosolica da quella mitocondriale, le cellule sono state sottoposte a permeabilizzazione con digitonina 0.05% aggiunta a buffer di saccarosio [250 mM Saccarosio, 10mM HEPES, 10mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, aprotinina 20µg/ml, leupeptina 20µg/ml, PMSF 1mM] ed i campioni sono stati incubati 20 min. in ghiaccio. Successivamente, gli stessi campioni sono stati centrifugati a 14000 rpm per 10 minuti a 4°C ed il surnatante, contenente la frazione citoplasmatica solubile (citosol), è stato conservato. Per solubilizzare la frazione mitocondriale il pellet, una volta lavato con 200µl buffer di saccarosio [pH 7.1], è stato estratto con buffer di lisi [Tris-HCl 50 mM, pH 7.5; NaCl 150 mM; 0.1% TritonX-100; EDTA 2 mM; 0.5% deoxicolic acid; 0.1% SDS; aprotinina 20µg/ml; leupeptina 20µg/ml; PMSF 1mM].

Per separare la frazione citosolica da quella nucleare solubile, le cellule di ALCL seminate ad una concentrazione di  $0.5 \times 10^6$ /ml, sono state trattate con BZ o esposte a HS per 30 minuti a 43°C per KARPAS e SUDHL1 e 42°C per FE-PD. Dopo abbondante lavaggio in PBS 1x freddo, le cellule sono state immerse in ghiaccio secco per 2 min., e quindi risospese in Hypo-buffer [pH 7.9] [10mM HEPES; 10mM KCl; 0.2mM EDTA; 0.1mM EGTA, 1mM DTT, aprotinina 20µg/ml, leupeptina 20µg/ml, PMSF 1mM] e mantenute in agitazione costante, in ghiaccio, per 5 minuti. Il detergente non-ionico NP40 è stato quindi aggiunto ad una

concentrazione finale del 2% v/v, ed i campioni sono stati lasciati in agitazione a 4°C per ulteriori 5 minuti. Per favorire la frammentazione delle membrane mantenendo l'integrità nucleare, i campioni sono passati attraverso un ago 26.5 gauge per una decina di volte (in ghiaccio) e poi centrifugati per 2 min. a 10000 x g. Il surnatante ottenuto, che rappresenta la frazione citosolica (citoplasmatica solubile), è stato trasferito in provette sterili, mentre il pellet, costituito da nuclei integri, dopo due lavaggi con PBS 1x è stato risospeso in Hyperbuffer [pH 7.9] [20mM HEPES; 0.4M NaCl; 1mM EDTA; 1mM DTT; aprotinina 20µg/ml, leupeptina 20µg/ml, PMSF 1mM]. I nuclei sono stati poi disgregati meccanicamente per mezzo di un pestello elettrico e lasciati a roteare a 4°C per 30 min. Al termine, la frazione nucleare solubile è stata purificata mediante centrifugazione a 10000 x g a 4°C per 5 minuti, trasferendo in provette sterili il surnatante ottenuto.

Per ottenere gli estratti citosolici sui quali è stata valutata l'interazione tra Hsp70 e Citocromo C, le cellule sono state o meno esposte a HS per 30 minuti (43°C per KARPAS e SUDHL1; 42°C per FE-PD) e le proteine estratte con Cytosolic Extraction Buffer [50mM PIPES, 50mM KCl, 5mM EGTA, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT; digitonina 0.05%]. Gli estratti citosolici solubili ottenuti sono stati lasciati incubare per 1 e 2 ore con 1mM ATP (Invitrogen corporation, USA) e 10µM Citocromo-C (Sigma Aldrich Inc.), al termine della reazione a 37°C, 30µg di lisato proteico, diluito in soluzione riducente RLB, sono stati risolti su gel di poliacrilamide (15% SDS-PAGE).

## **2.5 Immunofluorescenza**

Per verificare la localizzazione cellulare delle proteine, cellule di ALCL sono state lavate per due volte in PBS 1x, risospese in 50µl dello stesso e 2µl posti su un vetrino per fluorescenza. Le cellule sono state quindi fissate con paraformaldeide al 4% (20 min.), lavate in PBS 1x (4x5min.), e permeabilizzate in una soluzione di 0.2% Triton X-100 in PBS 1x per 10 min. Questo processo è stato quindi interrotto incubando 10 min. i vetrini in una soluzione 100mM di glicina, prima, di FCS al 10%, poi. A questo punto le cellule sono state incubate con anticorpi primari in 2% FCS-PBS, a 37°C per 60min. Successivamente, i vetrini sono stati abbondantemente lavati (4x in PBS) e incubati per 60min a 37°C, al buio, con anticorpi secondari fluoresceinati (1/500) Alexa 488 goat anti-rabbit (Abs/Em 495/519nm) e Alexa 546 goat anti-mouse (Abs/Em, 556/573nm). I vetrini sono stati lavati con PBS 1X (3x10 min) e montati in glicerolo/PBS 1:1 addizionato di DAPI (1/500). Il DAPI (6,6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride), è un colorante fluorescente blu che si intercala ai filamenti di DNA e caratterizza quindi distintamente il nucleo dalla frazione citoplasmatica. Le immagini

acquisite con telecamera digitale Leica DC 300, montata su microscopio Leica DMLB, ad ingrandimento 63x. L'analisi dell'immagine è stata eseguita con software Leica IM1000 (Leica Microsystem Ltd, Switzerland).

## 2.6 Real time PCR

Le cellule ottenute da linee cellulari trattate o meno, o da biopsie linfonodali, sono state risospese in Trizol (Invitrogen, CA) e successivamente 1µg di RNA totale estratto è stato utilizzato per la retro-trascrizione tramite Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies, Italy). I prodotti di retrotrascrizione sono stati utilizzati per l'analisi con *real-time quantitative* PCR (RQ-PCR) con utilizzo di sonda TaqMan. I seguenti primers sono stati disegnati per Hsp70 con Primer Express versione 2.0 (Applied Biosystems) per RQ-PCR TaqMan: forward 5'-GAGAAGGACGAGTTTGAGCACAA-3'; reverse 5'-TGGTACAGTCCGCTGATGATG-3', e sonda FAM-TAMRA: 5'-AGGAAGGAGCTGGAGCAGGTGTGTAACC-3'. La qualità del cDNA ottenuto è stata verificata con l'utilizzo di trascritti costitutivamente espresso nei campioni analizzati quali: RNA ribosomale (18S) e GAPDH. Nel caso dell'utilizzo di 18S come controllo, l'RNA prima del processo di retro-trascrizione è stato sottoposto a trattamento con DNA-free<sup>TM</sup> kit (Ambion, Inc.). Tutte le reazioni sono avvenute tramite ABI Prism Sequence Detection System (Applied Biosystems, CA, USA). Ogni campione è stato testato in triplicato e i livelli di mRNA sono stati poi normalizzati su quelli del trascritto di controllo.

## 2.7 Immunoistochimica

23 biopsie tumorali di pazienti pediatriche affette da ALCL fissate in paraffina sono state analizzate tramite immunoistochimica utilizzando un anticorpo anti-Hsp70 (Santa Cruz Biotech.). Le biopsie linfonodali sono state fissate su vetrini appositi, sottoposti ad un trattamento con xilolo e passaggi successivi in percentuale crescente di alcol assoluto per eliminare la paraffina. Successivamente per inibire l'attività della perossidasi endogena, le biopsie sono state esposte ad H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allo 0,03%. Successivamente si è proceduto con il processo definito smascheramento, dalla formalina, per via enzimatica o tramite microonde a pH 8-6, attraverso il quale si permette il riconoscimento dell'antigene da parte dell'anticorpo. Dopo lavaggio in PBS, i vetrini con le biopsie sono stati lasciati reagire con l'anticorpo anti-Hsp70 per circa 1h a temperatura ambiente e poi esposti a DAB (3,3-Diaminobenzidina), substrato della perossidasi che dà luogo alla formazione del prodotto finale della reazione del tipico colore marrone, e infine esposti a colorazione con ematossilina.

### 3. RISULTATI

#### 3.1 Hsp70 e HSF1 in linee cellulari di ALCL

Recenti studi hanno dimostrato che la sovra-espressione delle proteine da heat shock, hsp (heat shock proteins), coinvolte nella maturazione delle proteine neo-sintetizzate e nella rinaturazione di quelle parzialmente denaturate in condizioni di stress, è un evento che nelle cellule tumorali è spesso associato a fenomeni di chemioresistenza.

Da un nostro studio condotto su linee cellulari di ALCL è emerso che cellule che esprimono l'oncoproteina NPM-ALK (KARPAS e SUDHL1) risultano meno sensibili all'attività pro-apoptotica dell'inibitore proteosomale Bortezomib (BZ), rispetto a cellule ALK negative (FE-PD)[74]. Inoltre abbiamo confermato anche in cellule di ALCL quanto già osservato, ovvero che nel caso di inibizione proteosomale si ha induzione dell'espressione della proteina Hsp70.

Alla luce di queste osservazioni abbiamo quindi valutato tramite immunoblotting lo stato stazionario delle proteine Hsp90, Hsp70, Hsp60 e Hsp40 in 4 linee cellulari di ALCL NPM-ALK<sup>+</sup> (KARPAS, SUDHL1, SR786, SUPM2) e in una linea NPM-ALK<sup>-</sup> (FE-PD) osservando che solo Hsp70 è differenzialmente espressa tra cellule NPM-ALK positive e negative, e in particolare, quasi totalmente assente in queste ultime (fig.1a). L'espressione del trascritto di Hsp70 è stata quindi analizzata nelle medesime condizioni di crescita e coltura e come si può osservare in Fig.1b, la quantità relativa di RNA di Hsp70 in FE-PD è inferiore di più di 20 volte al valore medio delle linee cellulari NPM-ALK<sup>+</sup>. Come noto, la proteina responsabile della trascrizione di Hsp70, sia in condizioni fisiologiche che sotto stress è l'HSF1 (Heat Shock Transcription Factor 1) [62].

Abbiamo quindi valutato la presenza di HSF1 negli stessi estratti proteici analizzati per le hsp sopra elencate e dimostrato come questo fattore di trascrizione sia equamente espresso in tutte le linee cellulari studiate (Fig.1a). Per analizzare l'attività di HSF1, KARPAS, SUDHL1 e FE-PD sono state trattate con BZ per 16h, con concentrazioni egualmente citotossiche (100nM per le linee NPM-ALK<sup>+</sup> e 10nM per FE-PD) e sottoposte a sub-frazionamento per la valutazione dell'espressione proteica citoplasmatica e nucleare (Fig.1c). Come atteso, in seguito a trattamento con BZ, HSF1 è attivato in KARPAS e SUDHL1 come risulta dalla sua localizzazione nucleare e dalla comparsa di una banda di peso molecolare superiore (indicata con la freccia) che ne rappresenta la forma fosforilata, in associazione all'induzione di espressione di Hsp70 [35, 37]. In FE-PD invece la lieve induzione di Hsp70 e l'assenza di

accumulo nucleare e di fosforilazione di HSF1, suggeriscono la mancata attivazione dello stesso fattore di trascrizione.

### 3.2 Attività di HSF1 e interazione con Hsp70

Per analizzare più approfonditamente ruolo e attività di HSF1, cellule di ALCL: KARPAS, SUDHL1 e FE-PD, sono state esposte a *heat shock* (HS), stress non citotossico, quando di breve durata. Per ogni linea cellulare sono state messe a punto condizioni di temperatura e tempo di esposizione opportune, tali che non fosse indotta tossicità in presenza di sovra-regolazione di Hsp70. Dopo 30 minuti di HS e 16h a 37°C o trattamento con BZ per 16h, le cellule sono state processate come riportato nei Materiali e Metodi per l'analisi di Hsp70 e HSF1 mediante immunofluorescenza. La marcatura con colorante nucleare DAPI, è stata utilizzata per definire la localizzazione subcellulare di queste proteine. Come si può osservare in fig.2a, Hsp70 è solo debolmente rilevabile in FE-PD, e non abbiamo osservato induzione di HSF1 né con HS né con BZ, come precedentemente descritto in fig.1c. In KARPAS e SUDHL1 invece, l'intensità della fluorescenza per HSF1 aumenta in corrispondenza del nucleo, parallelamente all'induzione di Hsp70 sia con HS che, in particolare, con BZ (vedi frecce). Le cellule sottoposte a HS attivano rapidamente HSF1 e inducono Hsp70 sia durante lo shock termico che nelle prime ore di recupero a 37°C (dati non riportati). Successivamente l'attivazione del fattore di trascrizione viene inibita da parte delle stesse hsp (Hsp70 e Hsp90) [44], e quindi è possibile che la fluorescenza di HSF1 appaia meno intensa nelle cellule esposte a HS che in quelle trattate con BZ, come dimostrato dalle immagini in fig.2a.

Alla luce di queste osservazioni e al fine di delineare il ruolo delle heat shock proteins nel modulare l'attività di HSF1 nelle linee cellulari in studio, queste sono state trattate con BZ o esposte a HS, come descritto precedentemente, e gli estratti proteici sono stati immunoprecipitati con anticorpo anti-Hsp70 (Fig.2b). E' stato infatti dimostrato come le hsp possano avere sia ruolo inibitorio, che di attivazione retroattiva nei confronti del loro fattore di trascrizione [41-43].

Tramite immunoblotting è stata quindi valutata la presenza del complesso tra Hsp70 e HSF1, osservata solo in KARPAS e SUDHL1, sia con HS che con BZ, così come in misura minore nei controlli, in condizioni fisiologiche dove la presenza del complesso proteico è spiegabile con l'attività di regolazione basale esercitata da Hsp70. Nei campioni trattati con HS, e in particolare BZ, il peso molecolare di HSF1 subisce lo *shift* verso l'alto (come indicato dalla freccia) che è tipico della forma attiva del fattore di trascrizione, come confermato anche dall'immunoblotting su lisato proteico totale sottostante in fig.2b. L'incremento del

complesso tra Hsp70 e HSF1 dopo trattamento con HS e BZ in KARPAS299 e SUDHL1, può dipendere anche dall'elevata espressione di Hsp70 evidenziata anche dallo stato stazionario del lisato totale nell'immunoblotting in fig.2b.

Per approfondire il significato dell'interazione tra Hsp70 e HSF1, le cellule sono state trattate per 4h e 16h con BZ, ed analizzate mediante immunoprecipitazione e immunofluorescenza (Fig.3). L'analisi è stata estesa oltre che a KARPAS e SUDHL1, anche a FE-PD per verificare lo stato di HSF1 e la sua eventuale attivazione, dopo trattamenti di minore durata, utilizzando un anticorpo in grado di riconoscere sia la forma totale che fosforilata di HSF1. Tuttavia ciò che abbiamo notato è che il complesso tra Hsp70 e HSF1 aumenta parallelamente al tempo di esposizione al farmaco esclusivamente nelle due linee cellulari NPM-ALK positive, ma non in FE-PD (Fig.3a) dove non si osserva alcuna variazione nella espressione o localizzazione cellulare di HSF1, né dopo 4 né dopo 16h di trattamento (Fig.3b). Dalle immagini in fig.3b si può inoltre notare, come in KARPAS e SUDHL1, dopo 4h, Hsp70 sia concentrata prevalentemente a livello citoplasmatico, mentre HSF1 sia soprattutto nucleare. Dopo altre 12h di esposizione a BZ, l'espressione di Hsp70 è ulteriormente indotta dall'inibizione proteosomale e la sua localizzazione si estende anche al nucleo, come già osservato con un altro inibitore del proteosoma, MG132 [59, 61]. Questo potrebbe confermare l'incremento del complesso tra HSF1 e Hsp70 osservato in fig.3a a 16h di trattamento, suggerendo un ruolo di Hsp70 nel mantenere la localizzazione nucleare e l'attivazione di HSF1 come precedentemente dimostrato da altri [45].

E' interessante notare che Hsp70 si accumula in formazioni granulari citoplasmatiche, caratteristiche del trattamento con BZ risultato dell'accumulo di proteine denaturate e ubiquitinate che corrispondono alle strutture note come aggresomi composte anche da altre hsp, tra cui Hsc70 e Hsp40 [75, 76]. Dato che in letteratura anche Hsc70 è stato dimostrato avere ruolo nell'attivazione di HSF1, abbiamo valutato l'espressione e la distribuzione di questo chaperone nelle tre linee cellulari in studio, esposte per 16h a trattamento con Bortezomib, tramite immunofluorescenza ed immunoblotting [41].

Come si può osservare in fig.4a però in nessuna delle tre linee cellulari Hsc70 ha localizzazione nucleare in seguito a trattamento con BZ, né forma dei complessi rilevabili tramite immunoprecipitazione con HSF1 (dati non riportati).

Hsc70 forma invece, come Hsp70, strutture granulari citoplasmatiche simili agli aggresomi precedentemente descritti [76], inoltre l'espressione basale e indotta risultano comparabili sia in KARPAS, che in SUDHL1 e FE-PD (fig.4b). Queste osservazioni permettono perciò di

escludere un ruolo determinante di Hsc70 nel regolare stato e attività di HSF1 in questi modelli sperimentali.

### **3.3 Ruolo antiapoptotico di Hsp70 in linee cellulari NPM-ALK<sup>+</sup>**

Nelle cellule di ALCL BZ induce l'attivazione della via apoptotica mitocondriale, tuttavia nelle cellule NPM-ALK positive, questo fenomeno è meno evidente che in quelle NPM-ALK negative, per le quali sono sufficienti concentrazioni di farmaco 10 volte inferiori per indurre morte cellulare [74]. Come riportato in precedenza, le linee cellulari NPM-ALK<sup>+</sup> KARPAS e SUDHL1, mostrano livelli costitutivi di Hsp70 molto più elevati rispetto alle cellule NPM-ALK<sup>-</sup> FE-PD. Abbiamo quindi valutato la possibilità, già verificata in altri modelli tumorali, che la sovra-espressione di Hsp70 fosse implicata nella regolazione dei meccanismi antiapoptotici, che prevengono il rilascio o l'attivazione del Citocromo-C, che con Caspasi-9, APAF-1, e ATP forma il complesso proteico responsabile dell'esecuzione della via apoptotica intrinseca (apoptosoma) [49-54].

Per simulare la perdita di potenziale di membrana mitocondriale, e favorire l'attivazione del meccanismo apoptotico, al lisato proteico citosolico di cellule KARPAS, SUDHL-1 ed FE-PD, esposte a shock termico o non, è stato aggiunto ATP e Citocromo-C in condizioni non denaturanti. Dopo 60 o 120 min. a 37°C, i lisati sono stati valutati, mediante immunoblotting, per l'attivazione proteolitica della Caspasi-3 da parte dell'apoptosoma. Come si può osservare in fig.5a tutte e tre le linee cellulari presentano attivazione della Caspasi-3 (comparsa di frammenti a basso peso molecolare, funzionalmente attivi, indicati dalle frecce) nei lisati proteici esposti o meno a trattamento, suggerendo che Hsp70, anche quando indotta (dopo heat shock, HS), non inibisce l'attività dell'apoptosoma. Questa osservazione è stata anche confermata dall'incapacità della stessa Hsp70 di interagire direttamente con la proteina Citocromo-C, come osservato mediante immunoprecipitazione (dati non riportati).

Recentemente è stato dimostrato che Hsp70 ha la capacità di legare anche la proteina pro-apoptotica Bax e di prevenire così la perdita di permeabilità della membrana mitocondriale esterna. Per verificare quindi, se nelle linee cellulari di ALCL NPM-ALK<sup>+</sup>, Hsp70 contribuisca all'induzione di questo fenomeno, le cellule sono state trattate con BZ per 12h e la co-localizzazione di Bax e Hsp70 è stata valutata mediante immunofluorescenza utilizzando per Bax un anticorpo che riconoscesse specificatamente la forma attiva della proteina (anti-Bax 6A7). Come si può osservare in fig.5b, le cellule KARPAS risultano debolmente fluorescenti per la marcatura con anti-Bax 6A7, sia cellule di controllo che

trattate, mentre le cellule FE-PD trattate con BZ presentano zone di attivazione di Bax, come indicato dalla freccia, che risultano invece negative per Hsp70.

Per verificare se la mancata attivazione di Bax fosse conseguenza del legame con Hsp70, le cellule sono state trattate con BZ o mantenute a 37°C dopo HS, per 20h, e il complesso proteico Bax/Hsp70 è stato valutato mediante co-immunoprecipitazione con anticorpo specifico anti-Bax 6A7. Come si osserva in fig.6a le due proteine formano un complesso sia nei campioni esposti a HS che a BZ, ma solo nelle cellule NPM-ALK positive; mentre in FE-PD, che sono l'unica tra le linee cellulari di ALCL a mostrare una rilevante attivazione di Bax, non si osserva il complesso tra le due proteine. Queste stesse cellule sono poi state sottoposte a lisi differenziale per valutare la localizzazione citosolica e mitocondriale di Bax e Citocromo C. I dati riportati in fig.6b dimostrano che, in assenza di legame con Hsp70, nel caso di cellule FE-PD esposte a HS, Bax localizza a livello mitocondriale e in seguito a trattamento citotossico con BZ si ha in parallelo anche rilascio del Citocromo-C nel citosol. In cellule KARPAS e SUDHL1 invece Bax associa con Hsp70, dopo HS e BZ per le prime e in particolare dopo HS per le seconde, e rimane per questo sequestrato nella frazione citoplasmatica. Si può quindi affermare che nelle cellule NPM-ALK<sup>+</sup>, Hsp70 può inibire la traslocazione di Bax al mitocondrio e impedire la oligomerizzazione della proteina sulla membrana mitocondriale. Ciò rallenta in queste cellule il processo di attivazione della via apoptotica intrinseca in seguito a trattamento con Bortezomib, fenomeno che non si osserva in FE-PD.

### **3.4 Espressione di Hsp70 in campioni biotipici di ALCL**

Per valutare l'espressione di Hsp70 in campioni biologici di ALCL, sono state valutate mediante immunistochemica 23 biopsie linfonodali ottenute da un gruppo di pazienti pediatrici affetti da linfoma anaplastico a grandi cellule con età mediana di 10 anni e prevalentemente in stadio III (61%), di questi, 20 positivi per la presenza di NPM-ALK e 3 NPM-ALK negativi (fig.7). La limitata numerosità del secondo gruppo è rappresentativa della bassa frequenza di NPM-ALK<sup>-</sup> nella popolazione di bambini affetti da ALCL. Da questa analisi è emerso che 20/20 biopsie linfonodali NPM-ALK<sup>+</sup> sono positive per Hsp70 e 2/3 NPM-ALK<sup>-</sup>, sono negative per la proteina (vedi Tab1). Questi risultati analizzati con test di Fisher indicano un'associazione significativa ( $p= 0.0119$ ) tra l'espressione di NPM-ALK e la presenza di Hsp70.

Non è possibile invece condurre un'adeguata analisi statistica tra l'espressione di Hsp70 e l'andamento della malattia per il limitato numero di casi. E' da segnalare tuttavia come ad un

*follow up* mediano di 4,5 anni, 4/6 casi (67%), indipendentemente dall'espressione di NPM-ALK, con un valore di Hsp70 attribuito pari a 3 (in una scala di espressione crescente da 0 a 3), siano recidivati o deceduti contro solo 3/12 (25%) dei casi con espressione di Hsp70 compresa tra 0 e 2 (vedi Tab.1).

Abbiamo poi valutato tramite RQ-PCR l'espressione del trascritto di Hsp70 in 10 biopsie linfonodali di ALCL NPM-ALK<sup>+</sup>, ottenute da pazienti con età mediana di 9 anni e prevalentemente in stadio III (60%) e in 4 biopsie di linfonodi reattivi usati come controllo (fig.8). La distribuzione dell'espressione di Hsp70 dimostra che la mediana dei valori nel gruppo di controllo è di 0.21 (A), mentre nei linfonodi patologici corrisponde a 0.97 (B). L'espressione di Hsp70 nei linfonodi di ALCL NPM-ALK<sup>+</sup> è risultata quindi significativamente maggiore rispetto ai linfonodi reattivi (p=0.040) mediante test di Kruskal-Wallis.

### **3.5 Relazione tra NPM-ALK e Hsp70**

Considerata la differente espressione costitutiva di Hsp70 nella linea cellulare NPM-ALK<sup>-</sup> rispetto alle linee cellulari NPM-ALK<sup>+</sup> e la correlazione tra la sua espressione e la presenza di NPM-ALK in biopsie di ALCL, abbiamo valutato la possibilità che NPM-ALK possa controllare l'induzione di Hsp70 in cellule ALCL.

KARPAS, SUDHL1 e FEPD sono quindi state trattate con l'inibitore competitivo di NPM-ALK, WHI-P154 [77, 78] per 24h come indicato in fig.9a e al termine del trattamento, l'RNA totale estratto è stato analizzato mediante RQ-PCR per l'espressione del trascritto di Hsp70. Come si può osservare sia in KARPAS che in SUDHL1 la quantità relativa di Hsp70 nelle cellule trattate con 5µM WHI-P154 diminuisce rispetto al controllo non trattato del 50% nelle prime, e del 40% nelle seconde. Nelle cellule NPM-ALK<sup>-</sup> FEPD invece il trascritto di Hsp70, resta stabile, pur essendo le concentrazioni di WHI-P154 utilizzate pari a 60µM e 80µM.

Le concentrazioni utilizzate per KARPAS e SUDHL1 sono state scelte tra la minima concentrazione efficace nell'inibizione dell'attività enzimatica di NPM-ALK, e la massima non citotossica. Per FE-PD, sono state utilizzate concentrazioni adattate alla tollerabilità della linea cellulare, con effetto sulla fosforilazione di STAT3, imputabile probabilmente all'inibizione competitiva di JAK3 a concentrazioni così elevate di WHI-P154 [79]. Lo scopo di trattare la linea cellulare NPM-ALK<sup>-</sup> con una concentrazione così elevata di WHI-P154, è stato quello di escludere nelle linee NPM-ALK<sup>+</sup> l'osservazione di effetti non direttamente riconducibili all'inibizione dell'oncoproteina. Il risultato ottenuto dall'analisi del trascritto ci suggerisce che NPM-ALK o qualche proteina di trasmissione del segnale da essa controllata,

influenza i livelli di trascrizione di Hsp70. Alla luce di ciò, le cellule NPM-ALK positive sono state pretrattate con WHI-P154 o DMSO (come controllo) per 8h (5 $\mu$ M per KARPAS; 2,5 $\mu$ M per SUDHL1) ed esposte poi a stimoli attivanti la trascrizione di Hsp70, ovvero 16h di trattamento con BZ in concentrazione non citotossica (10nM per KARPAS e SUDHL-1 e 5nM per FE-PD) o mantenute per 16h a 37°C dopo HS. Al termine del trattamento le frazioni proteiche citoplasmatica e nucleare sono state ottenute come descritto in Materiali e Metodi. In fig.9b si può osservare che, in presenza di WHI-P154, si ha un calo nella distribuzione nucleare di HSF1, e in modo meno evidente, anche di Hsp70, in entrambe le frazioni sia con HS che con BZ. Abbiamo quindi valutato l'espressione di alcune chinasi o molecole legate alla via di trasduzione del segnale controllata da NPM-ALK, per verificare se inibendo l'attività dell'oncoproteina vi fossero delle variazioni nella loro espressione o dello stato di attivazione tali da influenzare l'attività di HSF1. KARPAS, SUDHL1, FE-PD (come controllo) sono state pre-trattate per 8h con WHI-P154 (5 $\mu$ M per KARPAS299; 2,5 $\mu$ M per SUDHL1; 80 $\mu$ M per FE-PD) e successivamente esposte o non, per ulteriori 16h a BZ in concentrazione non citotossica (10nM per KARPAS e SUDHL-1 e 5nM per FE-PD) e al termine del trattamento gli estratti proteici sono stati valutati tramite immunoblotting. In fig.10a si può osservare l'efficacia di WHI-P154 nel ridurre la fosforilazione di STAT3 in tirosina 705 (P-STAT3), target dell'attività di NPM-ALK, a riprova della sua inibizione verificata anche con un anticorpo specifico per la forma fosforilata in tirosina-664 di NPM-ALK (P-ALK) che diminuisce soprattutto in KARPAS, mentre la sua forma totale resta stabile. Abbiamo verificato poi che dosi singolarmente non citotossiche, o al più citostatiche, di BZ e WHI-P154, quando somministrate in combinazione, inducono apoptosi. Si può osservare infatti in fig.10a come ci sia un aumento dell'inibitore del ciclo cellulare p21, nei campioni trattati singolarmente con WHI-P154 o BZ probabilmente imputabile ad un blocco della proliferazione, in assenza di frammentazione del PARP (84kDa indicato dalla freccia) che invece è evidente nei campioni trattati con WHI+BZ, ma solo nelle cellule NPM-ALK<sup>+</sup> e non in FE-PD. Si sono analizzate poi alcune serin-treonin chinasi in forma totale e in quella fosforilata e attiva, che in diversi studi sono state ricondotte direttamente o indirettamente alla trascrizione di geni per hsp, tra queste: ERK1/2, JNK, p38, e le forme fosforilate p38<sup>T180/Y182</sup>, JNK<sup>T183/Y185</sup>, ERK1/2<sup>T202/Y204</sup> [80-83]. Come si può osservare in fig.10a, non si osservano cambiamenti nell'espressione della forma totale di alcuna di queste proteine. Per quanto riguarda invece la forma fosforilata attiva delle stesse, si nota un incremento di ERK1/2<sup>T202/Y204</sup>, evidente anche in FE-PD, evento che permette di escludere un effetto riconducibile all'inibizione di NPM-ALK. Si nota poi nei campioni trattati con WHI-P154 un

calo della forma fosforilata di p38, anche se la forma totale rimane stabile. Questo si osserva in maniera evidente solo nelle due linee NPM-ALK positive, e potrebbe essere riconducibile all'inibizione di NPM-ALK, come già dimostrato in studi precedenti con altre molecole o silenziamento trascrizionale dell'oncoproteina [84].

Nell'ipotesi che p38 possa essere coinvolta nell'attivazione di HSF1 e quindi, quando inibita, controllare negativamente la trascrizione di Hsp70, abbiamo trattato KARPAS e SUDHL1 con l'inibitore di p38, SB202190, in concentrazioni di 20, 40, 60  $\mu$ M per 16h e poi, per ulteriori 4h, con DMSO o BZ 100nM. Come si può osservare in fig.10b, l'espressione di Hsp70 diminuisce sia nei campioni trattati con il solo inibitore di p38 sia in quelli trattati con SB202190+BZ, nei quali è ridotta l'induzione di Hsp70 da una concentrazione non citotossica di 40 $\mu$ M SB202190 in KARPAS e 60 $\mu$ M in SUDHL1.

#### 4. DISCUSSIONE

La famiglia di Hsp70 è formata da proteine costitutivamente espresse e da proteine inducibili a diversa localizzazione cellulare, tra queste: Hsp70 è indotta in seguito a stress; Hsc70 è costitutivamente espressa e diffusa nel nucleo e nel citoplasma; Grp75 localizza a livello mitocondriale; e Grp78 invece si trova nel reticolo endoplasmatico. Ognuna di queste proteine, esercita una specifica funzione all'interno della cellula: dal trasporto alle modificazioni post-traduzionali delle proteine cellulari, dalla prevenzione dell'aggregazione proteica alla preservazione delle stesse in risposta a stress citotossici quali heat shock, trattamenti farmacologici, o stress ossidativo [27, 28]. Hsp70 in particolare, è tra queste quella più rapidamente indotta in condizioni che causano un aumento della denaturazione proteica e della proteolisi ed esercita quindi una funzione indispensabile per l'omeostasi cellulare. Tuttavia, in un contesto patologico come il cancro, Hsp70 può contribuire al mantenimento di meccanismi deregolati o alla conservazione di proteine mutate o ricombinanti che spesso sono alla base della trasformazione neoplastica [28, 48]. Anche la sola sovra-espressione di Hsp70, può indurre insorgenza di patologie quali il linfoma, in modello murino [85] e la sua espressione differenziale è spesso correlata al grado di aggressività in diversi istotipi tumorali. [55, 86, 87].

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare in modelli cellulari di linfoma anaplastico a grandi cellule (ALCL) caratterizzati dall'espressione o meno della chinasi oncogenica NPM-ALK, l'espressione e il ruolo di Hsp70 in condizioni fisiologiche o in seguito a trattamento farmacologico, estendendo l'analisi anche a campioni istologici ottenuti da pazienti pediatriche affetti da ALCL.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che Hsp70 è costitutivamente espressa a livelli elevati nelle cellule che esprimono NPM-ALK, inoltre Hsp70 in caso di esposizione a stress citotossici viene trascritta ed espressa in maniera efficace e repentina solo nelle linee cellulari NPM-ALK positive, mentre in cellule NPM-ALK negative FE-PD, è difficilmente rilevabile anche in seguito a stimoli induttori della sovra-espressione di questo chaperone. Causa di questa differenza di espressione di Hsp70 è la diversa attivazione del fattore di trascrizione delle hsp, HSF1, che nelle linee cellulari ALCL NPM-ALK<sup>+</sup> è molto più efficace rispetto a FE-PD, nelle quali non si nota, al contrario delle prime, la fosforilazione e la traslocazione nucleare di HSF1.

Hsp70, Hsc70, Hsp25 e Hsp90 possono avere un'azione di tipo regolatorio sul loro fattore di trascrizione e se Hsp90 regola negativamente HSF1, Hsc70 favorisce la sua attivazione,

mentre Hsp70, può avere entrambi gli effetti [42-45]. I nostri studi dimostrano che nelle cellule NPM-ALK<sup>+</sup>, Hsp70 interagisce con HSF1, in forma fosforilata, attiva e con distribuzione nucleare. Abbiamo quindi potuto ipotizzare un'azione regolatoria positiva di Hsp70 nei confronti di HSF1 in cellule NPM-ALK positive esposte a trattamento farmacologico o stress termico. L'incapacità delle cellule NPM-ALK<sup>-</sup>, FE-PD, di attivare la trascrizione di Hsp70 anche in seguito a stress, è probabilmente il fattore responsabile della loro maggiore sensibilità a calore rispetto alle cellule NPM-ALK<sup>+</sup> che esprimendo hsp in elevate quantità, riescono a preservare l'omeostasi cellulare evitando l'induzione dell'apoptosi, alla quale sono invece soggette cellule FE-PD nelle medesime condizioni di esposizione a *heat shock*.

Hsp70 è stato associato a fenomeni di chemioresistenza in varie forme di leucemia e linfoma B grazie alla funzione che esercita nel preservare le cellule tumorali dall'apoptosi [55-58, 65]. Hsp70 infatti ha la capacità di legare proteine apoptogeniche quali AIF (apoptosis inducing factor), Citocromo C, Bax e impedire l'attivazione della via apoptotica mitocondriale, inibendo il meccanismo a più livelli [46, 49-54]. E' noto in particolar modo che il trattamento con inibitori proteosomali quali lactacystin, MG132, Bortezomib, induce l'accumulo di proteine non correttamente conformate o parzialmente denaturate che generano una forte condizione di instabilità cellulare con conseguente attivazione di HSF1 che promuove la trascrizione di Hsp70 [59-64]. Questo meccanismo limita l'efficacia di questi farmaci poiché favorisce la preservazione delle proteine denaturate durante il trattamento e induce meccanismi di resistenza [63, 65, 67, 69, 71].

Nel nostro studio abbiamo dimostrato che la capacità di attivare HSF1 e indurre l'espressione di Hsp70 favorisce la sopravvivenza delle linee NPM-ALK<sup>+</sup> a trattamento con inibitori del proteosoma quali Bortezomib, inibendo l'induzione e l'esecuzione del meccanismo apoptotico mitocondriale, osservato invece nelle cellule NPM-ALK<sup>-</sup>, mediante il legame con la proteina pro-apoptotica Bax. A conferma di quanto osservato sui modelli *in vitro* abbiamo dimostrato che la presenza di elevata espressione di Hsp70 nelle biopsie linfonodali di pazienti pediatriche affetti da ALCL sembra correlare con un peggior andamento della malattia, anche se l'esigua numerosità dei casi non ha permesso la validazione di questa osservazione mediante un'analisi statistica. Abbiamo invece potuto verificare su questi stessi campioni che esiste un legame significativo tra l'espressione di Hsp70 e la presenza della chinasi ricombinante NPM-ALK, dal momento che tutti i preparati istologici di ALCL NPM-ALK<sup>+</sup> sono risultati positivi ad Hsp70.

Inoltre tramite l'analisi di espressione trascrizionale abbiamo riportato per la prima volta una sovra-espressione statisticamente significativa di Hsp70 in linfonodi tumorali di pazienti affetti da ALCL NPM-ALK<sup>+</sup> rispetto a biopsie di linfonodi non neoplastici, osservazione che potrebbe attribuire ad Hsp70 un ruolo di marcatore per l'identificazione di cellule ALCL NPM-ALK<sup>+</sup>, in quanto presente a livelli nettamente inferiori nei tessuti sani.

In accordo con i nostri risultati, altri studi hanno evidenziato il legame tra l'espressione di proteine ricombinanti implicate nella tumorigenesi di diversi modelli tumorali quali, ALL o CML, e l'elevata espressione di Hsp70. E' il caso ad esempio di TEL-AML-1, prodotto proteico della traslocazione t(12;21)(p13;q22), la più frequente nelle leucemie linfoblastiche acute (ALL) pediatriche, del quale è nota la capacità di interferire con l'attivazione dell'apoptosi, anche se non sono ancora stati identificati i meccanismi molecolari responsabili. Diakos et al. hanno dimostrato in cellule REH, che all'inibizione di TEL-AML1 corrisponde una riduzione dell'espressione trascrizionale e proteica di Hsp70 e Hsp90, così come in cellule BaF3 trasfettate con un vettore esprimente il prodotto di fusione viene attivata la trascrizione degli stessi geni delle heat shock proteins [88]. Anche l'oncoproteina BCR-ABL, espressa nel 90-95 %, delle leucemie mieloidi croniche (CML) pediatriche e prodotto della traslocazione t(9;22), è stata collegata all'espressione di Hsp70. Ray et al. hanno dimostrato che sia le linee cellulari, che i blasti di pazienti affetti da CML BCR-ABL<sup>+</sup>, esprimono alti livelli costitutivi di Hsp70, così come le cellule che esprimono ectopicamente BCR-ABL [57]. Guo et al. hanno poi dimostrato che in cellule BCR-ABL<sup>+</sup>, HSF1 è fosforilato e il trattamento con Imatinib, inibitore specifico di BCR-ABL riduce drasticamente l'espressione di Hsp70 [58].

NPM-ALK è anch'essa una chinasi ricombinante prodotto della traslocazione t(2;5) e diversi studi hanno dimostrato il suo potenziale oncogenico e l'importanza del suo ruolo per la sopravvivenza delle cellule di ALCL [89-92]. In particolare oltre a quanto già dimostrato riguardo il suo potenziale pro-mitogenico e antiapoptotico mediato dall'attivazione dei pathway di PI3K/Akt e STAT3, studi più recenti hanno dimostrato il ruolo di NPM-ALK nell'attivazione di MEK/ERK, ERK1/2, e p38 [78, 93, 94, 84], chinasi responsabili anche della fosforilazione e regolazione di HSF1, unitamente ad altre ancora del tutto sconosciute [33-37, 40].

Nel nostro studio utilizzando l'inibitore di NPM-ALK WHI-P154, abbiamo dimostrato come l'inattività di NPM-ALK in assenza di citotossicità, riduca la trascrizione e l'espressione di Hsp70 costitutiva, come anche la sua induzione in seguito a *heat shock* e a trattamento con BZ, agendo probabilmente sulla fosforilazione attivatoria di HSF1 e sulla sua localizzazione

nucleare, fenomeni che non si osservano nella linea cellulare NPM-ALK negativa, utilizzata come controllo per l'attività di WHI-P154.

Abbiamo infine iniziato ad analizzare la possibilità di un coinvolgimento di chinasi seriniche controllate da NPM-ALK nel modulare l'attività di HSF1 e abbiamo dimostrato, in accordo con diversi studi precedentemente citati, che l'inibizione di NPM-ALK induce inattivazione della MAPK, p38. Anche se non è stata ancora dimostrata una correlazione diretta tra p38 MAPK e il fattore di trascrizione HSF1, diversi studi hanno dimostrato come l'inibizione farmacologica di questa serin-treonin chinasi, mediante SB202190 o SCIO-469, abbia come effetto la riduzione dell'espressione di Hsp27 nei modelli tumorali sottoposti a trattamento con inibitori del proteosoma (Bortezomib in particolare), e l'aumentata sensibilizzazione delle cellule tumorali al trattamento con questi ultimi [81, 82].

In cellule di glioma sottoposte a inibizione farmacologica di p38-MAPK e ERK1/2 con SB202190 e SB203580 rispettivamente, o a induzione dell'espressione di mutanti inattivi delle stesse, si osserva una riduzione della sintesi di hsp70 e dell'attività sul suo promotore, inoltre in altri studi successivi è stata riportata un'attività di regolazione positiva di p38 sull'espressione di hsp70 in diversi modelli cellulari [83] [80, 95, 96].

Ciò che abbiamo osservato anche nel nostro studio, seppur preliminarmente, è che in linee cellulari NPM-ALK<sup>+</sup> l'inibizione di p38, ha come effetto la riduzione dell'espressione indotta di Hsp70, effetto che non si riscontra con PD98059 e LY294002, inibitori rispettivamente di MEK e PI3K (dati non riportati). Queste analisi lasciano quindi supporre un coinvolgimento di p38 nella regolazione di HSF1 in linee cellulari ALCL NPM-ALK<sup>+</sup>, meritevole di ulteriori approfondimenti ed ulteriori indagini.

In conclusione, questo ha studio dimostrato che Hsp70 è costitutivamente espresso ad alti livelli in cellule NPM-ALK positive, cellule che hanno inoltre la capacità di indurre l'espressione in modo molto rapido ed efficace grazie all'attivazione del fattore di trascrizione HSF1 in condizioni di stress cellulare o durante trattamento farmacologico.

Ciò conferisce un vantaggio notevole per la chemioresistenza e potrebbe essere anche all'origine dell'elevata espressione del trascritto di Hsp70 osservata anche nei linfonodi NPM-ALK<sup>+</sup> di pazienti affetti da ALCL, dimostrata per la prima volta dal nostro studio. Hsp70 potrebbe quindi essere proposto come possibile indicatore di presenza di malattia per gli ALCL NPM-ALK<sup>+</sup>.

Inoltre i nostri dati suggeriscono che l'espressione di Hsp70, che è statisticamente correlata alla presenza di NPM-ALK sia nei tessuti patologici che nelle linee cellulari, potrebbe dipendere dalla chinasi stessa, tramite l'attivazione della serin-treonin chinasi p38.

Infine abbiamo verificato come in linee cellulari di ALCL, l'inibizione di NPM-ALK in combinazione con l'esposizione a Bortezomib sia un efficace strumento terapeutico per superare l'eventuale resistenza a trattamento con BZ in ALCL NPM-ALK<sup>+</sup> o al fine di utilizzare dosi di farmaco inferiori rispetto a quelle utilizzate singolarmente e con ugual efficacia.



## BIBLIOGRAFIA

1. Stein, H., et al., *The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells*. Blood, 1985. **66**(4): p. 848-58.
2. Stein, H., et al., *CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features*. Blood, 2000. **96**(12): p. 3681-95.
3. Falini, B., et al., *ALK expression defines a distinct group of T/null lymphomas ("ALK lymphomas") with a wide morphological spectrum*. Am J Pathol, 1998. **153**(3): p. 875-86.
4. Leoncini, L., et al., *Expression of the ALK protein by anaplastic large-cell lymphomas correlates with high proliferative activity*. Int J Cancer, 2000. **86**(6): p. 777-81.
5. Morris, S.W., et al., *Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma*. Science, 1994. **263**(5151): p. 1281-4.
6. Pulford, K., et al., *Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1*. Blood, 1997. **89**(4): p. 1394-404.
7. Lamant, L., et al., *A new fusion gene TPM3-ALK in anaplastic large cell lymphoma created by a (1;2)(q25;p23) translocation*. Blood, 1999. **93**(9): p. 3088-95.
8. Ma, Z., et al., *Inv(2)(p23q35) in anaplastic large-cell lymphoma induces constitutive anaplastic lymphoma kinase (ALK) tyrosine kinase activation by fusion to ATIC, an enzyme involved in purine nucleotide biosynthesis*. Blood, 2000. **95**(6): p. 2144-9.
9. Touriol, C., et al., *Further demonstration of the diversity of chromosomal changes involving 2p23 in ALK-positive lymphoma: 2 cases expressing ALK kinase fused to CLTCL (clathrin chain polypeptide-like)*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3204-7.
10. Falini, B., et al., *ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome*. Blood, 1999. **93**(8): p. 2697-706.
11. Gascoyne, R.D., et al., *Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma*. Blood, 1999. **93**(11): p. 3913-21.
12. Borer, R.A., et al., *Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm*. Cell, 1989. **56**(3): p. 379-90.
13. Morris, S.W., et al., *ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK)*. Oncogene, 1997. **14**(18): p. 2175-88.
14. Pulford, K., S.W. Morris, and F. Turturro, *Anaplastic lymphoma kinase proteins in growth control and cancer*. J Cell Physiol, 2004. **199**(3): p. 330-58.
15. Mason, D.Y., et al., *Nucleolar localization of the nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase is not required for malignant transformation*. Cancer Res, 1998. **58**(5): p. 1057-62.
16. Bischof, D., et al., *Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(4): p. 2312-25.
17. Fujimoto, J., et al., *Characterization of the transforming activity of p80, a hyperphosphorylated protein in a Ki-1 lymphoma cell line with chromosomal translocation t(2;5)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 4181-6.
18. Bai, R.Y., et al., *Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of large-cell anaplastic lymphoma is a constitutively active tyrosine kinase that utilizes phospholipase C-gamma to mediate its mitogenicity*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(12): p. 6951-61.
19. Kuefer, M.U., et al., *Retrovirus-mediated gene transfer of NPM-ALK causes lymphoid malignancy in mice*. Blood, 1997. **90**(8): p. 2901-10.
20. Wellmann, A., et al., *The activated anaplastic lymphoma kinase increases cellular proliferation and oncogene up-regulation in rat 1a fibroblasts*. FASEB J, 1997. **11**(12): p. 965-72.
21. Nishikori, M., et al., *High-level expression of BCL3 differentiates t(2;5)(p23;q35)-positive anaplastic large cell lymphoma from Hodgkin disease*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2789-96.

22. Raetz, E.A., et al., *The nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase fusion protein induces c-Myc expression in pediatric anaplastic large cell lymphomas*. *Am J Pathol*, 2002. **161**(3): p. 875-83.
23. Bai, R.Y., et al., *Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway*. *Blood*, 2000. **96**(13): p. 4319-27.
24. Slupianek, A., et al., *Role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase-mediated lymphomagenesis*. *Cancer Res*, 2001. **61**(5): p. 2194-9.
25. Zamo, A., et al., *Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death*. *Oncogene*, 2002. **21**(7): p. 1038-47.
26. Amin, H.M. and R. Lai, *Pathobiology of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma*. *Blood*, 2007. **110**(7): p. 2259-67.
27. Parcellier, A., et al., *Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **304**(3): p. 505-12.
28. Mayer, M.P. and B. Bukau, *Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism*. *Cell Mol Life Sci*, 2005. **62**(6): p. 670-84.
29. Mosser, D.D. and R.I. Morimoto, *Molecular chaperones and the stress of oncogenesis*. *Oncogene*, 2004. **23**(16): p. 2907-18.
30. Nollen, E.A. and R.I. Morimoto, *Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(Pt 14): p. 2809-16.
31. Sreedhar, A.S. and P. Csermely, *Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review*. *Pharmacol Ther*, 2004. **101**(3): p. 227-57.
32. Page, T.J., et al., *Genome-wide analysis of human HSF1 signaling reveals a transcriptional program linked to cellular adaptation and survival*. *Mol Biosyst*, 2006. **2**(12): p. 627-39.
33. Pirkkala, L., P. Nykanen, and L. Sistonen, *Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond*. *FASEB J*, 2001. **15**(7): p. 1118-31.
34. Bijur, G.N. and R.S. Jope, *Opposing actions of phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of HSF-1 activity*. *J Neurochem*, 2000. **75**(6): p. 2401-8.
35. Sarge, K.D., S.P. Murphy, and R.I. Morimoto, *Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(3): p. 1392-407.
36. Park, J. and A.Y. Liu, *JNK phosphorylates the HSF1 transcriptional activation domain: role of JNK in the regulation of the heat shock response*. *J Cell Biochem*, 2001. **82**(2): p. 326-38.
37. Wang, X., et al., *Regulation of molecular chaperone gene transcription involves the serine phosphorylation, 14-3-3 epsilon binding, and cytoplasmic sequestration of heat shock factor 1*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(17): p. 6013-26.
38. Wang, X., et al., *Interactions between extracellular signal-regulated protein kinase 1, 14-3-3epsilon, and heat shock factor 1 during stress*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(47): p. 49460-9.
39. Wang, X., et al., *Phosphorylation of HSF1 by MAPK-activated protein kinase 2 on serine 121, inhibits transcriptional activity and promotes HSP90 binding*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(2): p. 782-91.
40. Guettouche, T., et al., *Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress*. *BMC Biochem*, 2005. **6**: p. 4.
41. Ahn, S.G., et al., *Heat-shock cognate 70 is required for the activation of heat-shock factor 1 in mammalian cells*. *Biochem J*, 2005. **392**(Pt 1): p. 145-52.
42. Zou, J., et al., *Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1*. *Cell*, 1998. **94**(4): p. 471-80.
43. Baler, R., J. Zou, and R. Voellmy, *Evidence for a role of Hsp70 in the regulation of the heat shock response in mammalian cells*. *Cell Stress Chaperones*, 1996. **1**(1): p. 33-9.
44. Shi, Y., D.D. Mosser, and R.I. Morimoto, *Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors*. *Genes Dev*, 1998. **12**(5): p. 654-66.

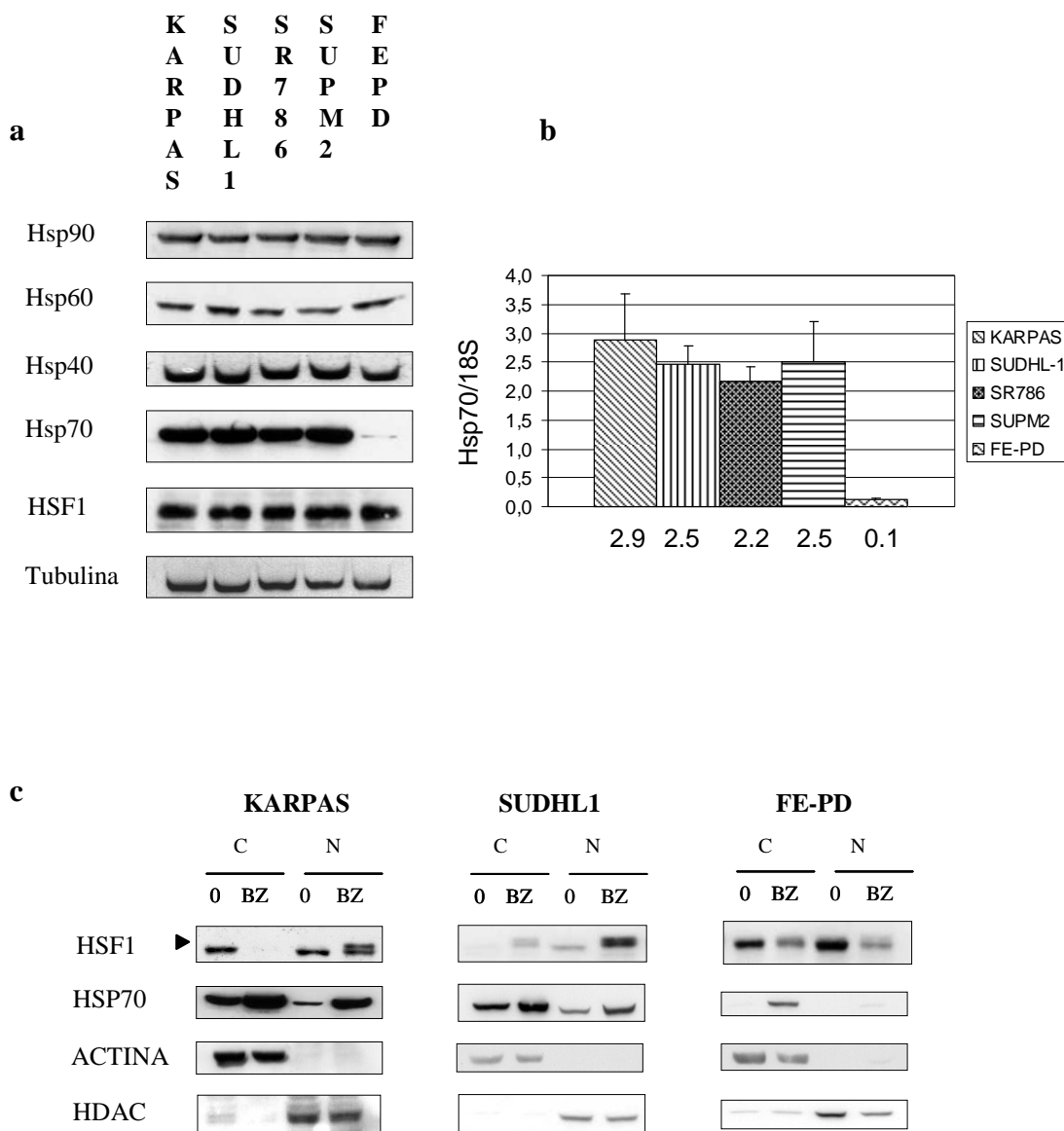
45. Seo, H.R., et al., *Heat shock protein 25 or inducible heat shock protein 70 activates heat shock factor 1: dephosphorylation on serine 307 through inhibition of ERK1/2 phosphorylation.* J Biol Chem, 2006. **281**(25): p. 17220-7.
46. Garrido, C., et al., *Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **286**(3): p. 433-42.
47. Beere, H.M., "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 13): p. 2641-51.
48. Rohde, M., et al., *Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms.* Genes Dev, 2005. **19**(5): p. 570-82.
49. Beere, H.M. and D.R. Green, *Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis.* Trends Cell Biol, 2001. **11**(1): p. 6-10.
50. Stankiewicz, A.R., et al., *Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation.* J Biol Chem, 2005. **280**(46): p. 38729-39.
51. Gotoh, T., et al., *hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria.* Cell Death Differ, 2004. **11**(4): p. 390-402.
52. Pagliari, L.J., et al., *The multidomain proapoptotic molecules Bax and Bak are directly activated by heat.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(50): p. 17975-80.
53. Beere, H.M., et al., *Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(8): p. 469-75.
54. Bivik, C., I. Rosdahl, and K. Ollinger, *Hsp70 protects against UVB induced apoptosis by preventing release of cathepsins and cytochrome c in human melanocytes.* Carcinogenesis, 2007. **28**(3): p. 537-44.
55. Steiner, K., et al., *High HSP70-membrane expression on leukemic cells from patients with acute myeloid leukemia is associated with a worse prognosis.* Leukemia, 2006. **20**(11): p. 2076-9.
56. Pocaly, M., et al., *Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia.* Leukemia, 2007. **21**(1): p. 93-101.
57. Ray, S., et al., *Genomic mechanisms of p210BCR-ABL signaling: induction of heat shock protein 70 through the GATA response element confers resistance to paclitaxel-induced apoptosis.* J Biol Chem, 2004. **279**(34): p. 35604-15.
58. Guo, F., et al., *Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells.* Blood, 2005. **105**(3): p. 1246-55.
59. Holmberg, C.I., et al., *Formation of nuclear HSF1 granules varies depending on stress stimuli.* Cell Stress Chaperones, 2000. **5**(3): p. 219-28.
60. Mathew, A., et al., *Stress-specific activation and repression of heat shock factors 1 and 2.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(21): p. 7163-71.
61. Pirkkala, L., et al., *Disruption of heat shock factor 1 reveals an essential role in the ubiquitin proteolytic pathway.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(8): p. 2670-5.
62. Kim, D., S.H. Kim, and G.C. Li, *Proteasome inhibitors MG132 and lactacystin hyperphosphorylate HSF1 and induce hsp70 and hsp27 expression.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **254**(1): p. 264-8.
63. Kawazoe, Y., et al., *Proteasome inhibition leads to the activation of all members of the heat-shock-factor family.* Eur J Biochem, 1998. **255**(2): p. 356-62.
64. Zhen-Xian Du, H.-Y.Z., Xin Meng, Yan-Yan Gao, Ren-Long Zou, Bao-Qin Liu, Yifu Guan, Hua-Qin Wang *Proteasome inhibitor MG132 induces BAG3 expression through activation of heat shock factor 1* journal of cellular physiology, 2008. **217**(2).
65. Shringarpure, R., et al., *Gene expression analysis of B-lymphoma cells resistant and sensitive to bortezomib.* Br J Haematol, 2006. **134**(2): p. 145-56.
66. Westerheide, S.D., et al., *Triptolide, an inhibitor of the human heat shock response that enhances stress-induced cell death.* J Biol Chem, 2006. **281**(14): p. 9616-22.
67. Powers, M.V., P.A. Clarke, and P. Workman, *Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis.* Cancer Cell, 2008. **14**(3): p. 250-62.

68. Li, M., et al., *Synergistic promotion of breast cancer cells death by targeting molecular chaperone GRP78 and heat shock protein 70*. J Cell Mol Med, 2008.
69. Guo, F., et al., *Abrogation of heat shock protein 70 induction as a strategy to increase antileukemia activity of heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-demethoxy geldanamycin*. Cancer Res, 2005. **65**(22): p. 10536-44.
70. Gabai, V.L., K.R. Budagova, and M.Y. Sherman, *Increased expression of the major heat shock protein Hsp72 in human prostate carcinoma cells is dispensable for their viability but confers resistance to a variety of anticancer agents*. Oncogene, 2005. **24**(20): p. 3328-38.
71. Zaarur, N., et al., *Targeting heat shock response to sensitize cancer cells to proteasome and Hsp90 inhibitors*. Cancer Res, 2006. **66**(3): p. 1783-91.
72. Chakraborty, P.K., et al., *Resveratrol induces apoptosis in K562 (chronic myelogenous leukemia) cells by targeting a key survival protein, heat shock protein 70*. Cancer Sci, 2008. **99**(6): p. 1109-16.
73. Nimmanapalli, R., et al., *HSP70 inhibition reverses cell adhesion mediated and acquired drug resistance in multiple myeloma*. Br J Haematol, 2008. **142**(4): p. 551-61.
74. Bonvini, P., et al., *Bortezomib-mediated 26S proteasome inhibition causes cell-cycle arrest and induces apoptosis in CD-30+ anaplastic large cell lymphoma*. Leukemia, 2007. **21**(4): p. 838-42.
75. Johnston, J.A., C.L. Ward, and R.R. Kopito, *Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins*. J Cell Biol, 1998. **143**(7): p. 1883-98.
76. Garcia-Mata, R., et al., *Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera*. J Cell Biol, 1999. **146**(6): p. 1239-54.
77. Marzec, M., et al., *Inhibition of ALK enzymatic activity in T-cell lymphoma cells induces apoptosis and suppresses proliferation and STAT3 phosphorylation independently of Jak3*. Lab Invest, 2005. **85**(12): p. 1544-54.
78. Marzec, M., et al., *Oncogenic tyrosine kinase NPM/ALK induces activation of the MEK/ERK signaling pathway independently of c-Raf*. Oncogene, 2007. **26**(6): p. 813-21.
79. Changelian, P.S., et al., *The specificity of JAK3 kinase inhibitors*. Blood, 2008. **111**(4): p. 2155-7.
80. Seo, M.S., et al., *Implication of reactive oxygen species, ERK1/2, and p38MAPK in sodium salicylate-induced heat shock protein 72 expression in C6 glioma cells*. Int J Mol Med, 2005. **16**(5): p. 841-9.
81. Hideshima, T., et al., *p38 MAPK inhibition enhances PS-341 (bortezomib)-induced cytotoxicity against multiple myeloma cells*. Oncogene, 2004. **23**(54): p. 8766-76.
82. Navas, T.A., et al., *Inhibition of p38alpha MAPK enhances proteasome inhibitor-induced apoptosis of myeloma cells by modulating Hsp27, Bcl-X(L), Mcl-1 and p53 levels in vitro and inhibits tumor growth in vivo*. Leukemia, 2006. **20**(6): p. 1017-27.
83. Luss, H., W. Schmitz, and J. Neumann, *A proteasome inhibitor confers cardioprotection*. Cardiovasc Res, 2002. **54**(1): p. 140-51.
84. Hsu, F.Y., et al., *Downregulation of NPM-ALK by siRNA causes anaplastic large cell lymphoma cell growth inhibition and augments the anti cancer effects of chemotherapy in vitro*. Cancer Invest, 2007. **25**(4): p. 240-8.
85. Seo, J.S., et al., *T cell lymphoma in transgenic mice expressing the human Hsp70 gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **218**(2): p. 582-7.
86. Ralhan, R. and J. Kaur, *Differential expression of Mr 70,000 heat shock protein in normal, premalignant, and malignant human uterine cervix*. Clin Cancer Res, 1995. **1**(10): p. 1217-22.
87. Santarosa, M., et al., *Expression of heat shock protein 72 in renal cell carcinoma: possible role and prognostic implications in cancer patients*. Eur J Cancer, 1997. **33**(6): p. 873-7.
88. Diakos, C., et al., *RNAi-mediated silencing of TEL/AML1 reveals a heat-shock protein- and survivin-dependent mechanism for survival*. Blood, 2007. **109**(6): p. 2607-10.
89. Christensen, J.G., et al., *Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma*. Mol Cancer Ther, 2007. **6**(12 Pt 1): p. 3314-22.

90. Leventaki, V., et al., *NPM-ALK oncogenic kinase promotes cell-cycle progression through activation of JNK/cJun signaling in anaplastic large-cell lymphoma*. *Blood*, 2007. **110**(5): p. 1621-30.
91. Piva, R., et al., *Ablation of oncogenic ALK is a viable therapeutic approach for anaplastic large-cell lymphomas*. *Blood*, 2006. **107**(2): p. 689-97.
92. Wan, W., et al., *Anaplastic lymphoma kinase activity is essential for the proliferation and survival of anaplastic large-cell lymphoma cells*. *Blood*, 2006. **107**(4): p. 1617-23.
93. Turner, S.D., et al., *The NPM-ALK tyrosine kinase mimics TCR signalling pathways, inducing NFAT and AP-1 by RAS-dependent mechanisms*. *Cell Signal*, 2007. **19**(4): p. 740-7.
94. Staber, P.B., et al., *The oncoprotein NPM-ALK of anaplastic large-cell lymphoma induces JUNB transcription via ERK1/2 and JunB translation via mTOR signaling*. *Blood*, 2007. **110**(9): p. 3374-83.
95. Kim, H.P., et al., *Heat shock protein-70 mediates the cytoprotective effect of carbon monoxide: involvement of p38 beta MAPK and heat shock factor-1*. *J Immunol*, 2005. **175**(4): p. 2622-9.
96. Hung, J.J., et al., *Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinases confers cadmium-induced HSP70 expression in 9L rat brain tumor cells*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(48): p. 31924-31.

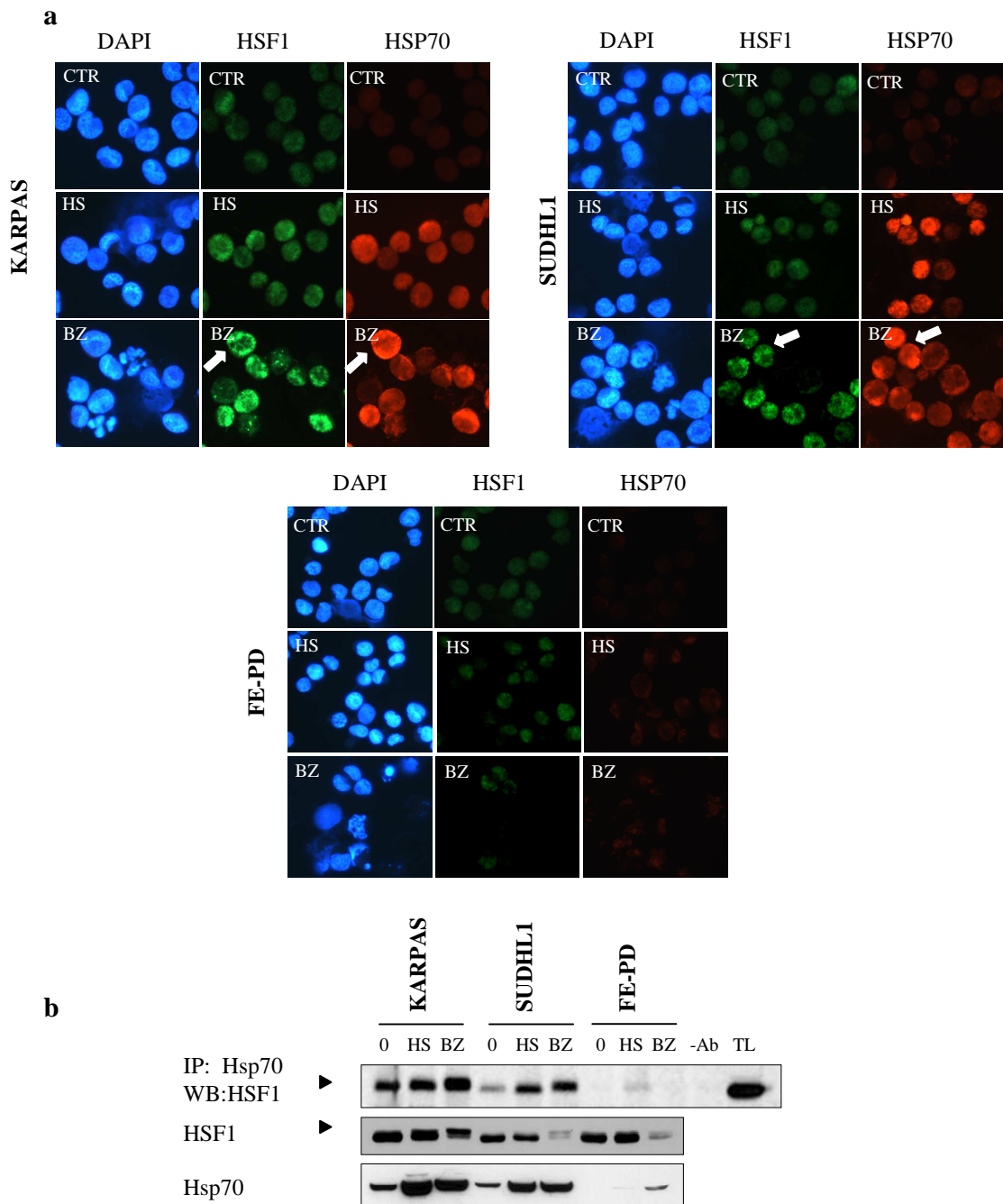


**Fig. 1**



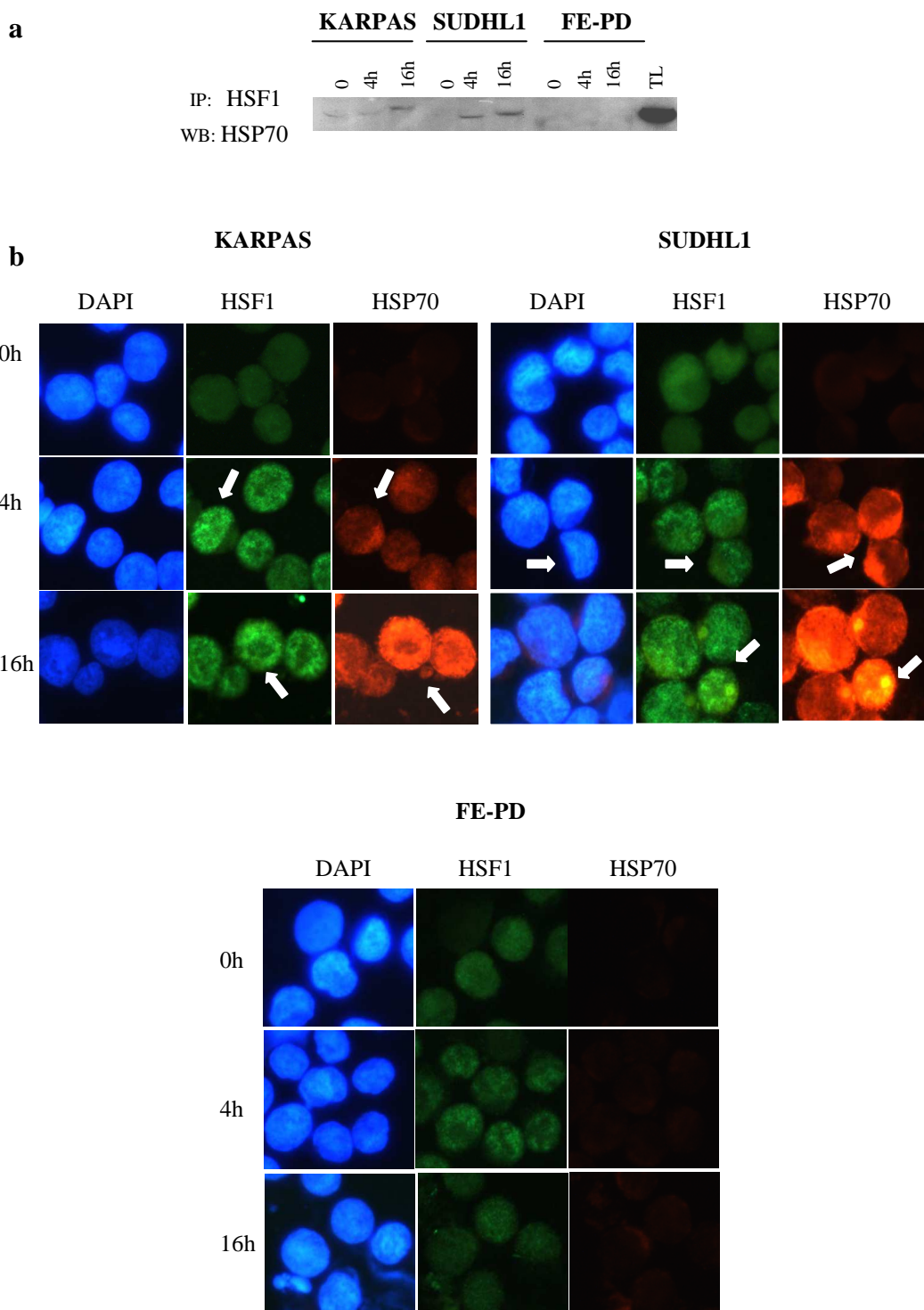
**Fig.1. (a)** 30µg di lisato proteico di cellule KARPAS, SUDHL1, SR786, SUPM2, FE-PD in crescita esponenziale sono stati risolti mediante SDS-PAGE e trasferiti su membrana di nitrocellulosa, marcata con anticorpi per Hsp90,-60,-70,-40, e HSF1, e utilizzando tubulina come controllo di normalizzazione. **(b)** Per analizzare il trascritto di Hsp70 tramite RQ-PCR è stato estratto l'RNA totale di cellule KARPAS, SUDHL1, SR786, SUPM2, FE-PD in crescita esponenziale e dopo retrotrascrizione ne è stata valutata la quantità in rapporto all'espressione del trascritto costitutivamente espresso 18S. I valori del rapporto tra Hsp70/18S sono riportati in ordinata e rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti con relativa deviazione standard. Il valore medio è riportato in ascissa. **(c)** KARPAS, SUDHL1, FE-PD sono state trattate per 16h con Bortezomib (BZ) in concentrazione rispettivamente di 100nM per le prime due e 10nM per la terza linea cellulare, e al termine del trattamento 30µg di estratto citoplasmatico (C) e nucleare (N) sono stati risolti tramite SDS-PAGE per la valutazione della distribuzione di HSF1, nella sua forma totale e fosforilata (indicata dalla freccia), e di Hsp70. HDAC e actina sono stati utilizzati come controlli per la purezza delle due frazioni.

**Fig. 2**



**Fig.2. (a)** KARPAS, SUDHL1 e FE-PD trattate o non (CTR) con BZ per 16h a 100 nM per le prime e 10nM per FE-PD (BZ) o esposte a heat shock (HS) a 43°C per KARPAS e SUDHL-1 e 42°C per FE-PD per 30 min. e raccolte dopo 16h a 37°C, sono state processate per immunofluorescenza e sono state fatte reagire con un anticorpo per Hsp70 e per HSF1 e infine marcate con colorante nucleare DAPI. **(b)** 200 µg di estratto proteico sono stati immunoprecipitati con 2µg di anticorpo anti-hsp70 da cellule KARPAS, SUDHL1 e FE-PD trattate con Bortezomib (BZ) o meno (0) per 16h o esposte a HS. E' stata quindi valutata l'espressione di HSF1 nella sua forma totale e fosforilata (indicata dalla freccia). -Ab= lisato proteico di KARPAS+ BZ immunoprecipitate con anti-IgG. TL= lisato totale. Gli estratti proteici totali sono stati inoltre valutati mediante immunoblotting, e HSF1 e Hsp70 identificati mediante l'uso di anticorpi specifici. La freccia indica la forma fosforilata di HSF1.

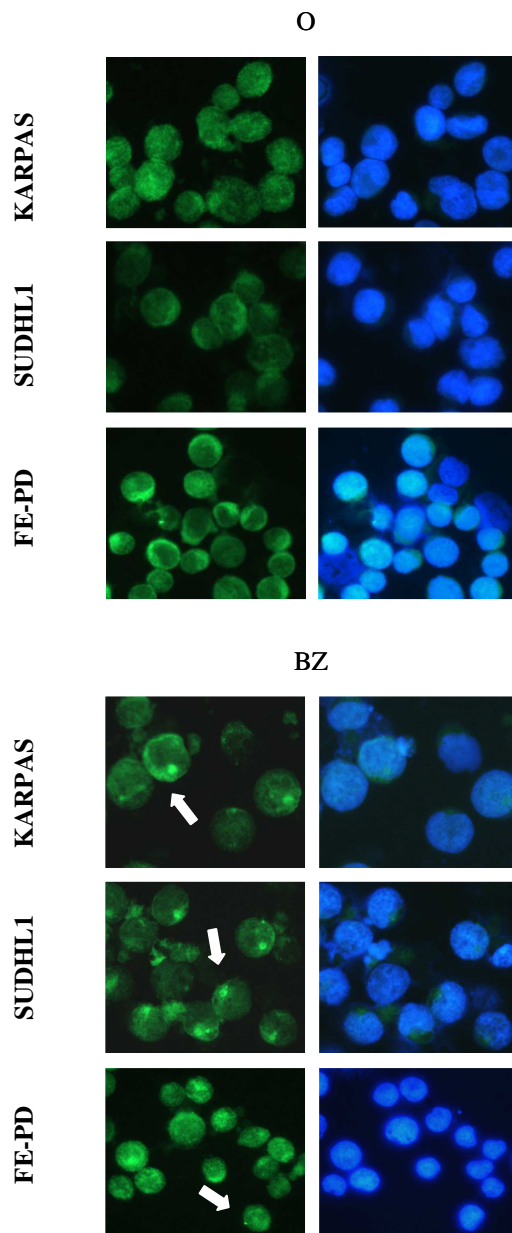
**Fig. 3**



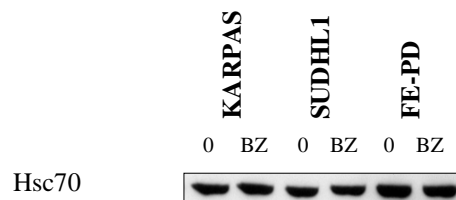
**Fig.3. (a)** 200 µg di estratto proteico solubile sono stati immunoprecipitati con 1µl di anticorpo anti-HSF1 da KARPAS, SUDHL1 e FE-PD trattate o non (0) con Bortezomib per 4h e 16h a 100 nM per le prime e 10nM per FE-PD. Tramite immunoblotting è stata quindi valutata l'espressione di Hsp70. Nello stesso gel è stato caricato un campione di lisato totale (TL) di KARPAS non trattate. **(b)** Le stesse cellule sono state anche processate per immunofluorescenza con anti-HSF1 e anti-Hsp70 e colorate con marcatore nucleare DAPI.

**Fig. 4**

**a**

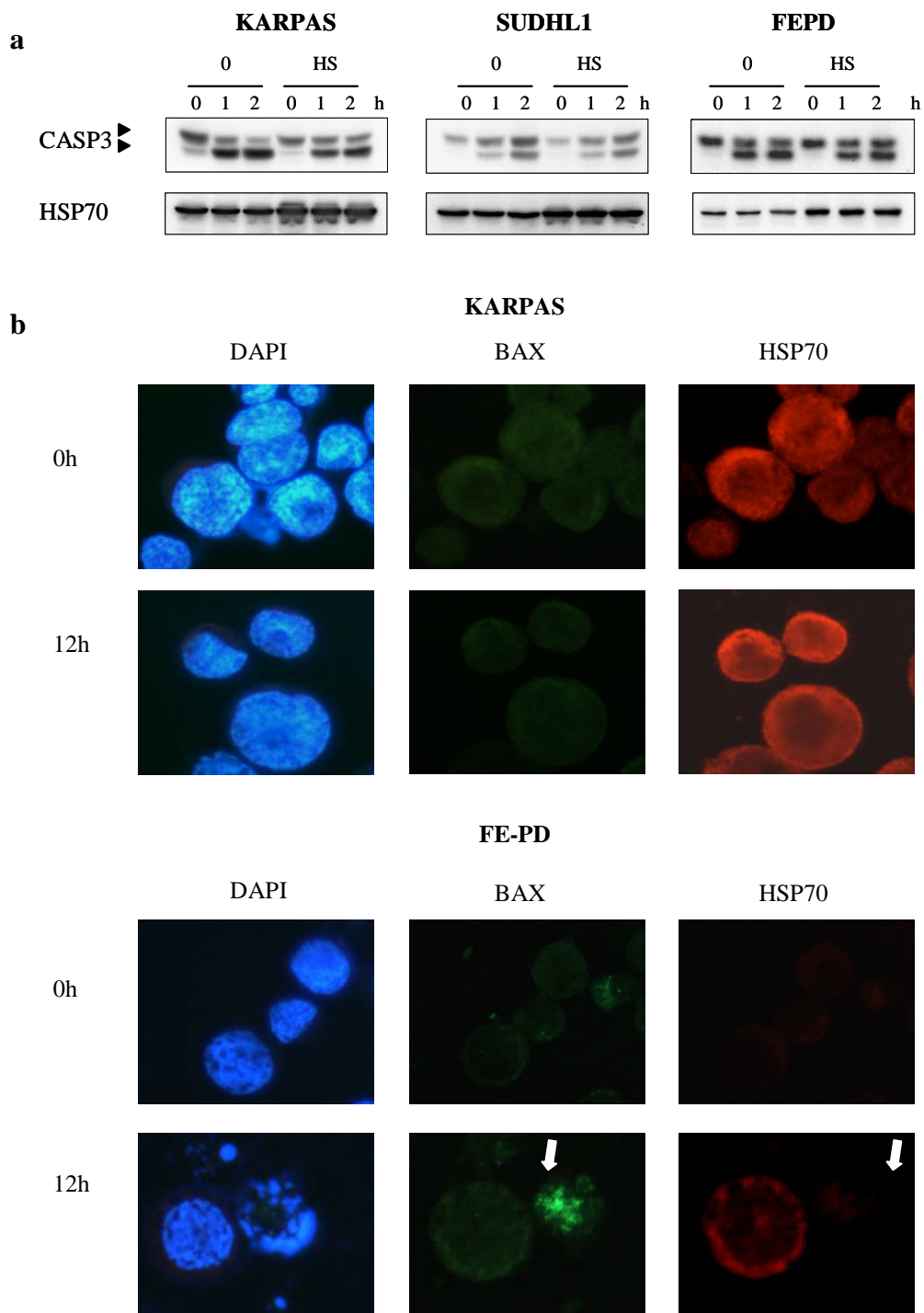


**b**



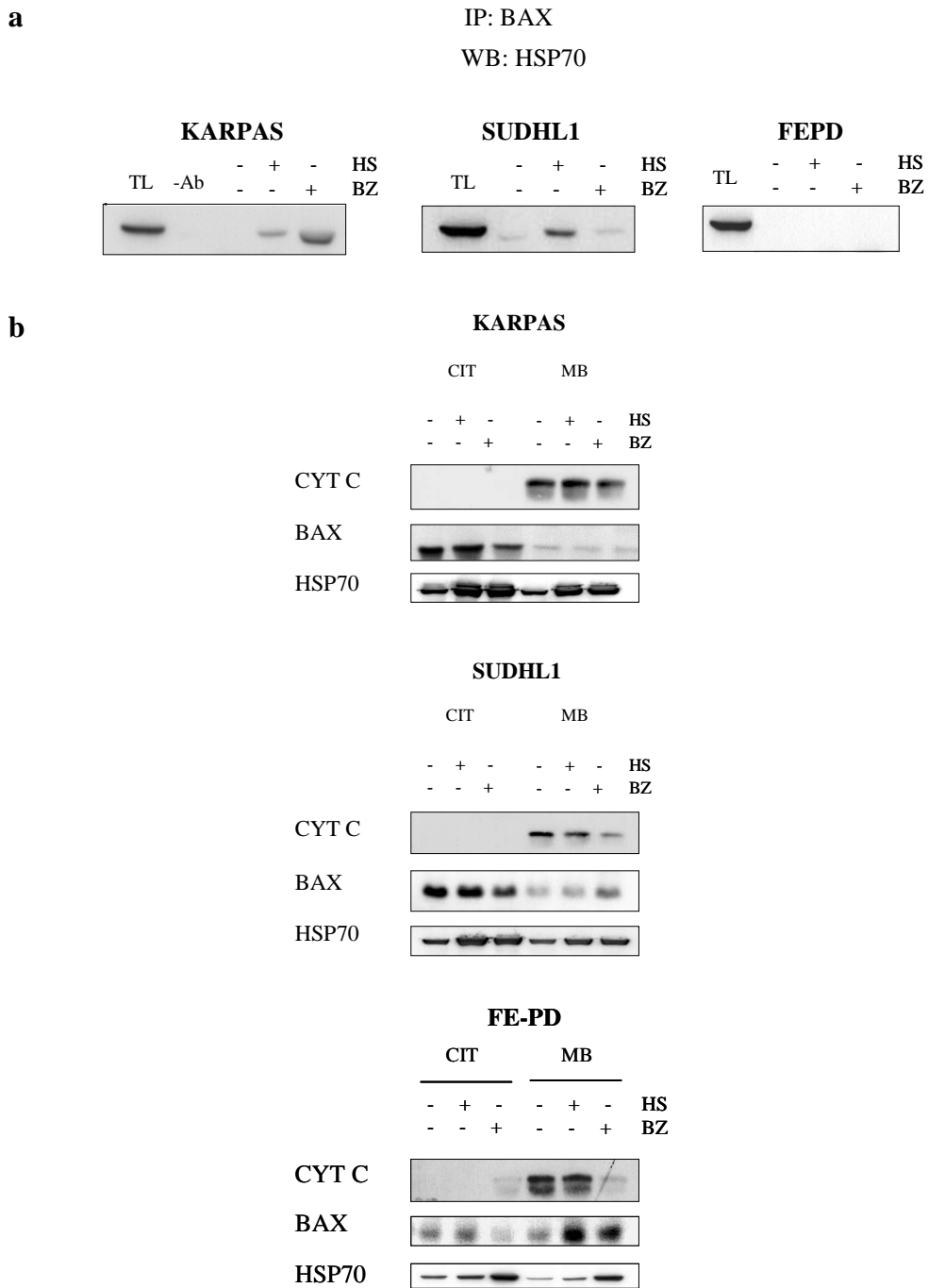
**Fig.4. (a)** KARPAS, SUDHL1 e FE-PD trattate o non (0) con BZ per 16h in concentrazione di 100 nM per le prime e 10nM per FE-PD sono state processate per immunofluorescenza e sono state fatte reagire con un anticorpo per Hsc70 e poi marcate con colorante nucleare DAPI . **(b)** 30µg di estratto proteico totale delle stesse cellule sono poi stati risolti mediante SDS-PAGE e trasferiti su membrana di nitrocellulosa marcata poi per Hsc-70.

**Fig. 5**



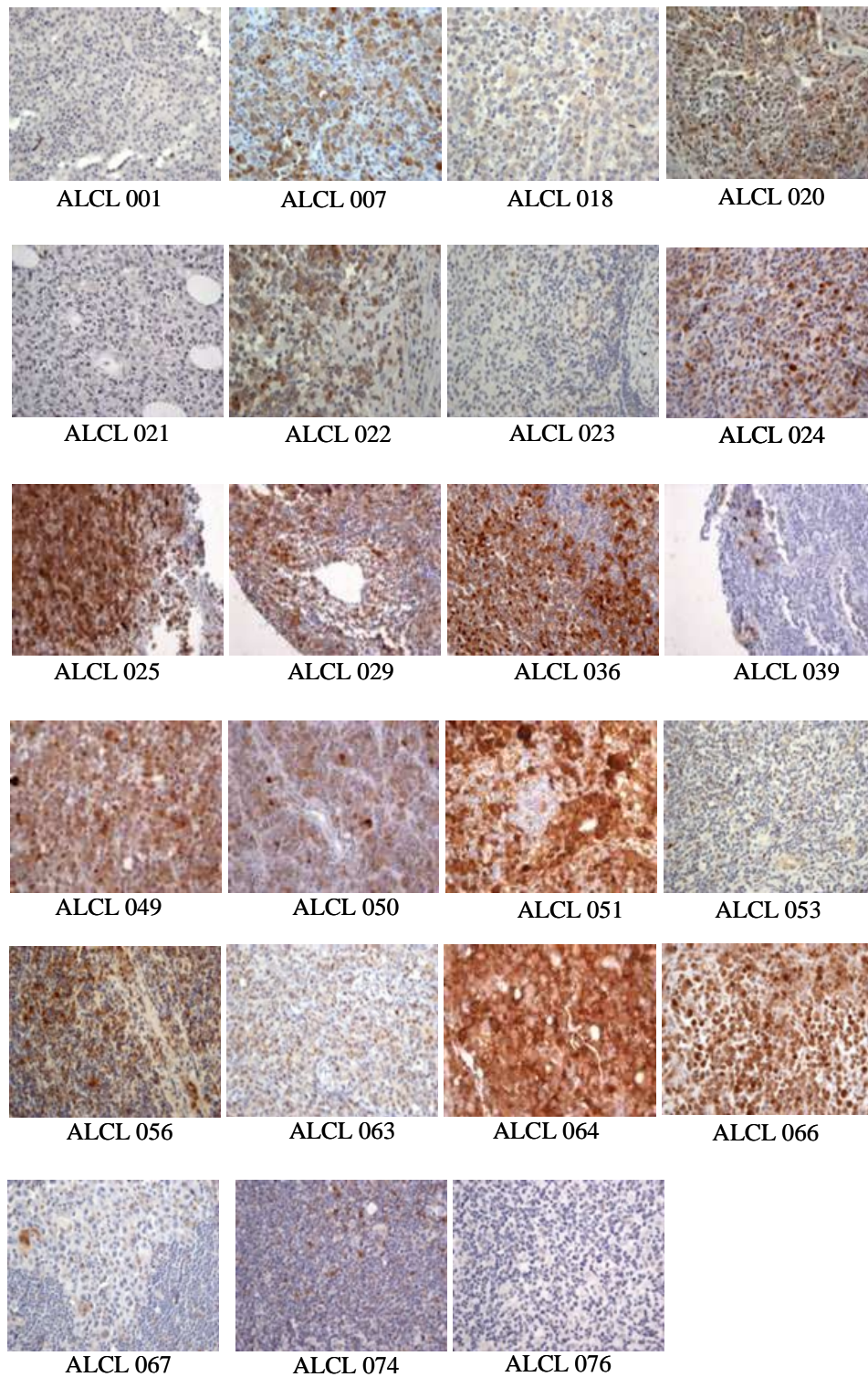
**Fig.5. (a)** KARPAS, SUDHL1 e FE-PD esposte o non (0) a heat shock (HS): 43°C per KARPAS e SUDHL-1 e 42°C per FE-PD per 30 min. sono state lisate con buffer per estrazione citosolica e agli estratti proteici sono stati aggiunti 1mM ATP e 10µM Citocromo- C per 0, 1 e 2 ore (0,1,2) a 37°C. Gli estratti proteici sono poi stati risolti mediante gel di acrilamide al 15% per la valutazione dei frammenti della Caspasi-3 da 17 e 12 kDa (indicati con le frecce) e di Hsp70. **(b)** Per valutare la localizzazione di Hsp70 e Bax cellule di KARPAS e FE-PD di controllo (0h) ed esposte a BZ per 12h sono state processate secondo protocollo per immunofluorescenza e marcate con un anticorpo anti-Bax (6A7) e con l'anticorpo anti-Hsp70 oltre che con il colorante nucleare DAPI.

**Fig.6**



**Fig.6. (a)** Estratto proteico solubile ottenuto tramite lisi con 1% CHAPSO è stato immunoprecipitato con anticorpo anti-Bax 6A7 da KARPAS, SUDHL1 e FE-PD trattate con Bortezomib (BZ) per 20h o esposte a HS e recuperate dopo 20h. Tramite immunoblotting è stata valutata l'espressione di Hsp70. Nello stesso gel è stato caricato il lisato totale (TL) di KARPAS non trattate e un controllo negativo per la precipitazione ovvero lisato proteico di KARPAS trattate con BZ, al quale non è stato aggiunto l'anticorpo anti-Hsp70 (-Ab). **(b)** Queste stesse cellule sono state processate per l'estrazione della frazione citoplasmatica (CIT) e mitocondriale (MB), tramite utilizzo di digitonina 0,05%, e gli estratti proteici sono stati risolti mediante SDS-PAGE per verificare la localizzazione di citocromo-C (CYTC), Bax e Hsp70.

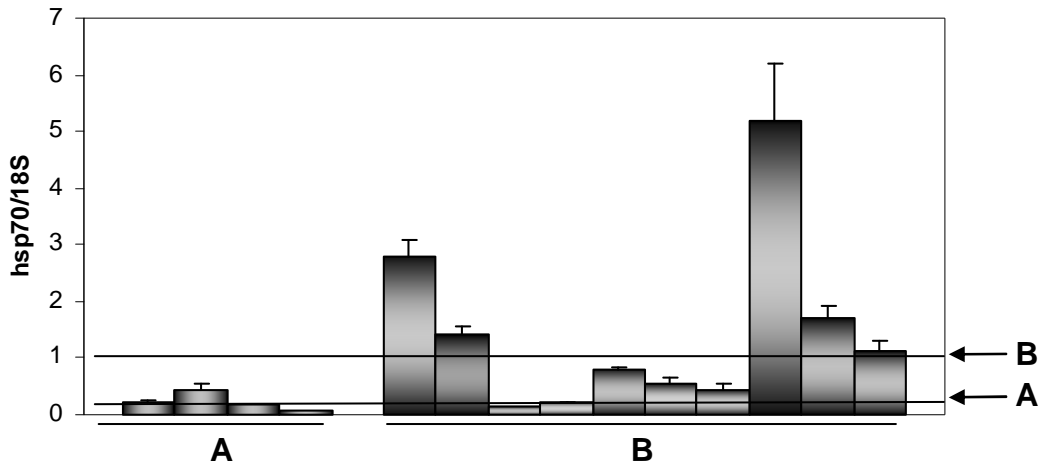
**Fig. 7**



**Fig.7** Tissue array di 23 biopsie linfonodali di pazienti pediatrici affetti da ALCL analizzate con tecnica di immunistochemica con anticorpo anti-Hsp70. La numerazione sottostante le fotografie corrisponde a quella riportata in Tab.1.

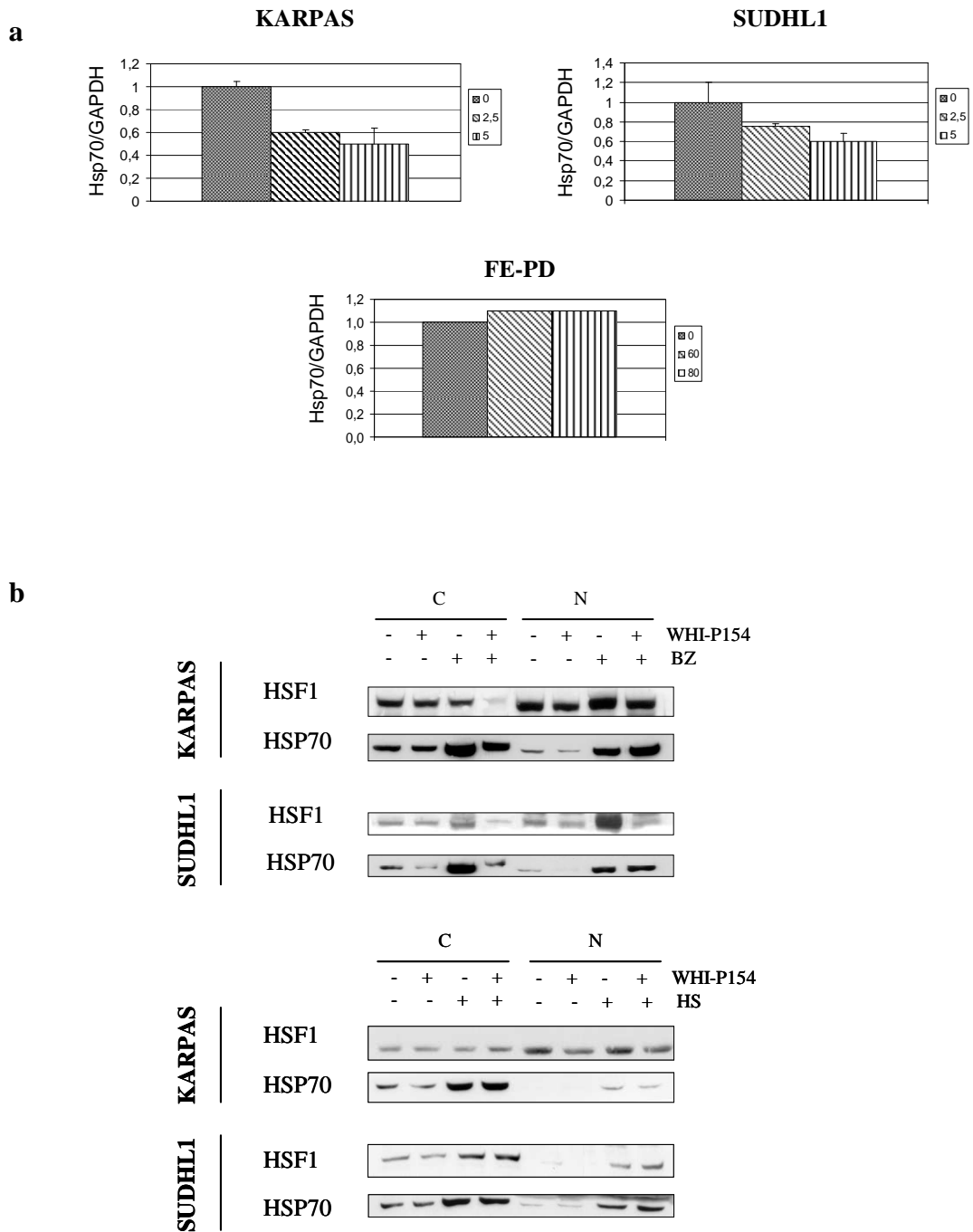
**Tab1**

|     | NPM-ALK | HSP70 | F.U. |
|-----|---------|-------|------|
| 001 | -       | 0     | -    |
| 007 | +       | 2     | DEC  |
| 018 | +       | 1     | -    |
| 020 | +       | 2     | N.N. |
| 021 | -       | 0     | N.N. |
| 022 | +       | 2     | -    |
| 023 | +       | 1     | REC  |
| 024 | +       | 2     | -    |
| 025 | +       | 3     | DEC  |
| 029 | +       | 3     | -    |
| 036 | +       | 3     | REC  |
| 039 | +       | 2     | -    |
| 049 | +       | 2     | -    |
| 050 | +       | 2     | -    |
| 051 | +       | 3     | -    |
| 053 | +       | 1     | -    |
| 056 | +       | 2     | -    |
| 063 | +       | 1     | -    |
| 064 | -       | 3     | DEC  |
| 066 | +       | 3     | REC  |
| 067 | +       | 1     | -    |
| 074 | +       | 1     | -    |
| 076 | +       | 1     | REC  |

**Fig.8**

**Tab.1** In tabella è riportato un riassunto dei dati relativi ad ognuno dei casi studiati in tissue array e riportati in fig.7. Nella prima colonna della tabella è riportato il numero relativo alla biopsia studiata, nella seconda colonna è riportata la positività o meno della biopsia studiata ad NPM-ALK, nella terza colonna il grado di positività (1-2-3) o l'assenza di espressione di Hsp70 (0); nell'ultima colonna (F.U.) è riportato il follow-up con mediana di 4.5 anni. DEC= deceduto, REC= recidivato, N.N.= non noto - = nessun evento. **Fig.8** Il grafico riassume i risultati ottenuti con RQ-PCR sul trascritto di Hsp70 presente in biopsie di bambini non affetti da patologia (A), e biopsie ottenute da un gruppo di pazienti pediatriche ALCL NPM-ALK+ (B). In ordinata sono riportate le medie di triplicati dei rapporti tra Hsp70 e 18S (trascritto costitutivamente espresso) con relativa deviazione standard. Inoltre nel grafico con le due frecce sono indicate le mediane dei due gruppi, la più bassa relativa ai controlli sani e la più alta alle biopsie patologiche.

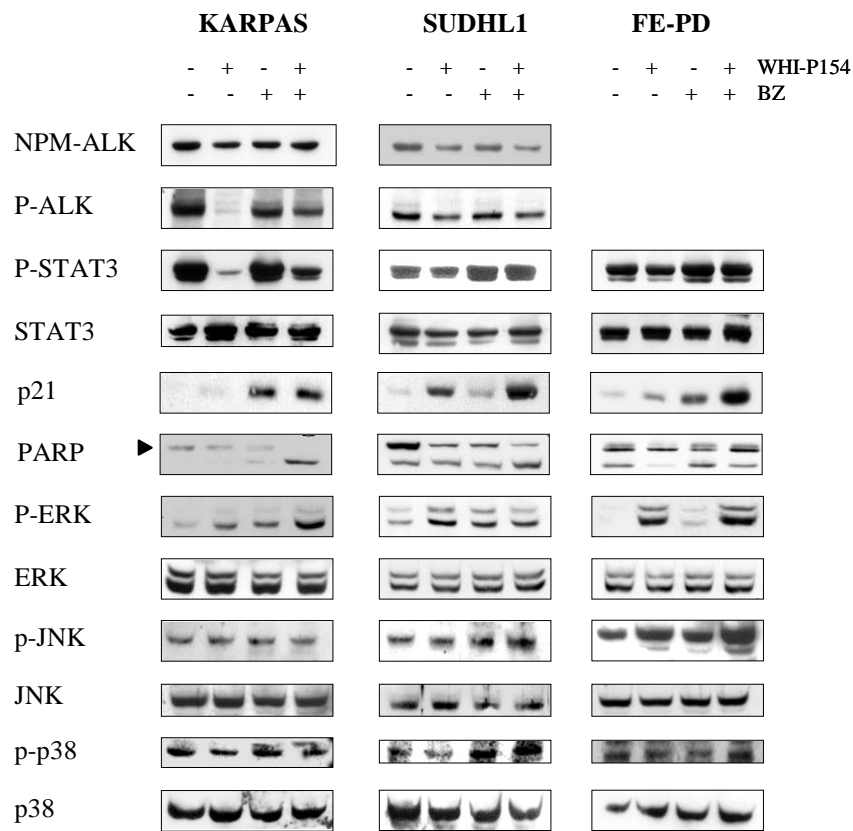
**Fig.9**



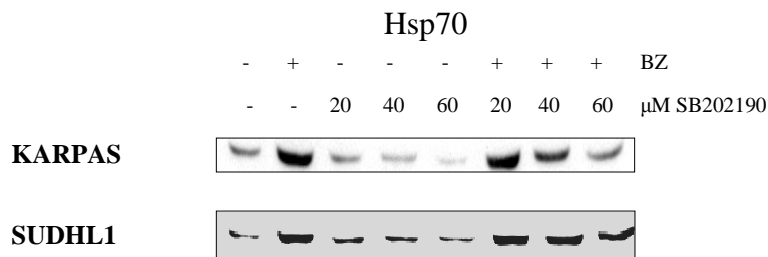
**Fig.9 (a)** L'RNA trascritto di Hsp70 ottenuto da KARPAS e SUDHL1 trattate con WHI-P154 0, 2.5μM e 5μM e FE-PD trattate con 0, 60μM e 80μM per 24h, è stato analizzato mediante RQ-PCR e il rapporto tra Hsp70 e GAPDH, trascritto costitutivamente espresso, è stato riportato in ordinata come media di tre repliche con relativa dev. standard (per FE-PD, non rilevabile nella scala riportata). **(b)** KARPAS e SUDHL1 pre-trattate o non, per 8h con WHI-P154 (2.5μM SUDHL1 e 5μM KARPAS) e poi esposte per 16h a BZ 10nM o HS come precedentemente descritto seguito da 16h a 37°C, sono state processate per estrazione differenziale citoplasmatica (C) e nucleare (N) ed analizzate tramite SDS-PAGE per l'espressione di HSF1 e Hsp70.

**Fig.10**

**a**



**b**



**Fig.10 (a)** Gli estratti proteici totali di KARPAS, SUDHL1 e FE-PD pre-trattate o non, per 8h con WHI-P154 (2.5 $\mu$ M SUDHL1, 5 $\mu$ M KARPAS, 80  $\mu$ M FE-PD) e poi esposte per 16h a BZ 10nM per le prime due e 5nM per FE-PD sono state risolte tramite SDS-PAGE e trasferite su membrane di nitrocellulosa, marcate con anticorpi diretti contro le proteine indicate in figura, tra cui forme fosforilate di serin-treonin chinasi (p-) e PARP nella forma totale e in quella frammentata indicata dalla freccia. **(b)** KARPAS e SUDHL1 pre-trattate o meno per 16h con 20,40,60  $\mu$ M SB202190, inibitore di p38-MAPK, e poi esposte per 4h a BZ 100nM sono state analizzate tramite immunoblotting per l'espressione di Hsp70.

- Ringrazio il Dott. P. Bonvini e la Dott.ssa L. Mussolin, per la collaborazione e il loro fondamentale supporto e aiuto.
- Ringrazio il Dott. E.S.G. D'Amore e la Dott.ssa M. Pillon per il loro contributo e la disponibilità.
- Ringrazio il Dott. A. Rosolen per la possibilità datami di sviluppare questo studio sotto la sua supervisione, in maniera autonoma e indipendente.